

В. А. ФРАДКИН

# аллергодиагностика *in vitro*



С 1614 989

КОНТРОЛЬНЫЙ ЛИСТОК  
СРОКОВ ВОЗВРАТА

КНИГА ДОЛЖНА БЫТЬ  
ВОЗВРАЩЕНА НЕ ПОЗЖЕ  
УКАЗАННОГО ЗДЕСЬ СРОКА

Колич. пред. выдач

~~1000~~

11/11864183

*[Signature]*

В. А. Фрадкин

# Аллергодиагностика *in vitro*



Москва · «Медицина» · 1975

# РЕФЕРАТ

Монография посвящена современному состоянию проблемы, связанной с разработкой и использованием методов диагностики аллергии *in vitro*.

Методы аллергодиагностики *in vitro* отличаются полной безвредностью (аллерген не вводится в организм больного), возможностью повторных исследований с различными интервалами между ними, объективными критериями учета реакций. Некоторые из методик, в частности, тест ППН характеризуется экспрессностью. Как в отечественной, так и в зарубежной литературе до настоящего времени нет руководства, специально освещающего теоретические основы аллергодиагностики *in vitro* с использованием лейкоцитов крови, ее практические возможности.

Настоящая монография имеет целью восполнить этот пробел. В ней содержится анализ данных мировой литературы в отношении качественных особенностей сенсibilизированных лейкоцитов крови. Обосновывается механизм аллергических реакций лейкоцитов. Специальные главы содержат сведения об особенностях аллергических реакций лейкоцитов зернистого и незернистого ряда. Приведены сведения о результатах диагностики *in vitro* при различных инфекционных процессах в неинфекционных аллергических заболеваниях. Сопоставляются результаты диагностики *in vitro* и *in vivo*.

В книге изложены методы, связанные с применением гранулоцитов и лимфоцитов крови, тучных клеток соединительной ткани и ряд других. Особое внимание уделено разработанному автором тесту ППН (показатель повреждения нейтрофилов).

Монография рассчитана на широкие круги научных сотрудников, интересующихся проблемами аллергии, и практических врачей: аллергологов, инфекционистов, терапевтов, педиатров.

ПОГАШЕНО

Ф 50100—113  
039(01)—75 99—75

© Издательство «Медицина» Москва 1975

Государственная  
научная библиотека  
им. В.Г. Болдинского



С. 1614989

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемая вниманию читателей книга принадлежит перу известного специалиста в области исследования специфических реакций лейкоцитов крови. Начиная с основополагающих и классических работ И. И. Мечникова выяснение роли этих элементов в формировании иммунитета постоянно привлекало внимание исследователей. Однако еще сравнительно недавно, в начале 60-х годов, Международный форум иммунопатологов констатировал отсутствие тестов, пригодных для выявления аллергии *in vitro*. Серьезным стимулом, обеспечившим успехи на этом пути, явилось бурное развитие аллергологии, вызванное повсеместным увеличением числа аллергических заболеваний.

Значение методов диагностики *in vitro* для клиники определяется прежде всего тем, что они избавляют от необходимости вводить в организм высокосенсибилизированного больного активные в антигенном отношении препараты, которые могут вызвать общие или очаговые реакции. Специфические изменения со стороны лейкоцитов крови более адекватно характеризуют клинические фазы аллергических процессов, чем кожные или внутрикожные пробы.

Автор монографии является создателем оригинальной методики — теста ППН (показатель повреждения нейтрофилов), который нашел весьма широкое применение в клиниках и лабораториях. Помимо этой пробы, в книге рассматриваются и такие реакции, как дегрануляция базофилов и тучных клеток, феномен бласттрансформации и задержки миграции лейкоцитов, специфический лейколиз.

Особая ценность монографии состоит в том, что автору удалось на современном теоретическом уровне разобрать сложные вопросы механизма аллергических реакций лейкоцитов крови и тучных клеток и показать предпосылки их применения в диагностических целях. Специальные

разделы посвящены анализу результатов, полученных в клинике с помощью новых методов. Такой комплексный подход к проблеме восполняет известный пробел, существовавший в этой области в литературе. Крайне важно, что автор четко и ясно изложил существо самих методов, что несомненно будет способствовать их внедрению в медицинскую практику. Можно не сомневаться в том, что монография доктора медицинских наук В. А. Фрадкина будет с удовлетворением встречена специалистами и практическими врачами, интересующимися аллергологией.

Академик АМН СССР проф. А. Д. Адо

## ВВЕДЕНИЕ

---

Учение об аллергии, сформировавшееся в первом десятилетии нашего века, относится к числу тех направлений биологической науки, которые оказывают непосредственное воздействие на все стороны клинической и профилактической медицины. К числу основных проблем современной аллергологии следует отнести оценку сенсibilизации организма к бактериальным, вирусным, грибковым аллергенам, аллергенам растительного, эпидермального и бытового происхождения, некоторым эндогенным продуктам (аутоаллергены), антибиотикам и др. Таким образом, указание А. А. Богомольца (1938) о том, что аллергия, выйдя за пределы иммунологии и серологии, стала актуальнейшей проблемой патофизиологии, морфологии, проблемой биофизики и биохимии, получило многочисленные подтверждения.

Совершенно очевидно, что успехи аллергологии неотделимы от используемых методов специфической диагностики. Как отмечает А. Д. Адо (1970), интерес к таким вопросам объясняется прежде всего тем, что специфическая диагностика позволяет вскрыть начальные стороны заболевания, когда клинические признаки болезни еще не являются выраженными.

Исследователи уже давно обратили внимание на то, что многие аллергические заболевания (поллинозы, сывороточная болезнь и ряд других) весьма широко распространены среди людей, а у лабораторных животных не возникают ни в естественных, ни в экспериментальных условиях. Изучение этих вопросов Н. Н. Сиротининым (1951) в сравнительно-эволюционном плане показало, что способность животного организма отвечать аллергическими реакциями на антигенные раздражения коррелирует со способностью вырабатывать антитела. И именно у человека антителообразование отличается весьма высокой организацией. Как

будет отмечено ниже, человеку свойственна также и усложненная структура и функция элементов белой крови.

До недавнего времени методы специфической диагностики сводились лишь к кожным, внутрикожным и подкожным пробам. Их роль в становлении учения об аллергии исключительно велика. Кожные пробы и сейчас остаются наиболее доступными тестами и находят повсеместное применение. Вместе с тем по мере накопления практического опыта и расширения номенклатуры аллергенов достаточно отчетливо обрисовались и присущие им недостатки. Оказалось, что у части больных реакции кожи на аллерген развиваются не по нормергическому типу (в этом случае повышение концентрации препарата вызывает усиление местной реакции), а по уравнительному, экзальтационному или парадоксальному типу. Было отмечено, что чувствительность кожи далеко не всегда коррелирует с уровнем сенсибилизации внутренних органов и систем, вовлеченных в патологический процесс, в связи с чем аллергологи начали более широко использовать провокационные тесты. Кроме того, при парентеральном введении некоторых аллергенов с целью диагностики приходится считаться с сенсибилизирующей активностью самого препарата. Наконец, при введении аллергена в организм больного нельзя исключить возможность возникновения системных или общих реакций, которые у отдельных лиц развиваются по анафилактическому типу.

Совокупность перечисленных причин побудила научных экспертов ВОЗ по общей и прикладной иммунологии рекомендовать в согласованной программе первоочередных исследований разработку методов оценки аллергии *in vitro*. В представленном ими в 1962 г. докладе № 286 обращалось внимание на отсутствие тестов, пригодных для практического применения. Последующее десятилетие принесло несомненные успехи на этом пути. В первую очередь они оказались связанными с изучением специфических реакций лейкоцитов крови на бактериальные и небактериальные аллергены. Этому способствовал ряд обстоятельств: 1) высокая иммунологическая активность лейкоцитов (в первую очередь лимфоцитов), их интимная связь с внутренней средой организма, 2) заметные сдвиги в ответных реакциях лейкоцитов на вещества антигенной природы в разных стадиях сенсибилизации организма, 3) доступность получения лейкоцитов из периферической крови и безвредность диагностики для больного.



В настоящее время используются и продолжают изучаться такие реакции элементов белой крови, как специфический лейколиз, показатель повреждения нейтрофилов крови *in vitro* (тест ППН), бласттрансформация и задержка миграции лимфоцитов крови, прямая и непрямая деградация базофилов, а также тест непрямой деградации тучных клеток. Позволяют ли все перечисленные феномены оценить состояние и уровень сенсibilизации организма или в отношении некоторых из них речь преимущественно может идти о характеристике иммунитета? Разумеется, каждая из перечисленных реакций сопряжена с определенными иммунологическими закономерностями, однако это не должно уводить нас в сторону от того факта, что при обследовании больного врачу приходится размышлять о соотношении между специфической аллергией и иммунитетом.

Следует подчеркнуть, что расширение показаний к применению реакций *in vitro* и клиническая интерпретация результатов диагностики неотделимы от разработки и внедрения новых аллергенов, углубления представлений о характере и особенностях сенсibilизации организма при различных процессах, а также от успехов общей иммунологии и, в частности, усовершенствования методов дифференцировки иммуноглобулинов.

В настоящей монографии предпринята попытка изложить предпосылки к разработке и использованию методов изучения аллергии *in vitro*, обсудить результаты, полученные с их помощью, а также привести описание самих методов, достаточное для того, чтобы специалисты, интересующиеся этой проблемой, могли воспроизвести их в лабораторных условиях.

## Г л а в а 1

### ЛЕЙКОЦИТЫ КРОВИ И ЗАДАЧИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИИ

---

Более 90 лет отделяют нас от исторического доклада И. И. Мечникова (1883), раскрывшего защитную функцию фагоцитоза как ответную реакцию организма на внедрение чужеродных веществ. Теория фагоцитов, указывал И. И. Мечников в статье «О борьбе клеток организма против инвазии микробов», может облегчить понимание явлений естественного и приобретенного иммунитета, поскольку фагоциты можно приучить захватывать те микробы, которых они ранее избегали. Такое заключение вытекало из результатов экспериментальных работ самого И. И. Мечникова и его последователей, наблюдавших заметное повышение активности клеток в отношении микроорганизмов, использованных ранее для вакцинации животных. Развита школой И. И. Мечникова клеточная теория иммунитета продолжает служить отправной точкой для многочисленных исследований, направленных на расшифровку специфических реакций микро- и макрофагов.

Один из выводов, который может быть сделан из сказанного, состоит в том, что характер изменений лейкоцитов крови человека в процессе развития специфической сенсибилизации организма в известной мере отличается от того, что обнаруживается при работе с элементами белой крови лабораторных животных. Так, было установлено, что пассивный перенос гиперчувствительности замедленного типа в экспериментальных условиях (на морских свинках, кроликах) удастся лишь при использовании целых, жизнеспособных лейкоцитов, в то время как у человека в этих же целях могут применяться и лейкоцитарные экстракты. Если у морских свинок длительность пассивно возникшей аллергии туберкулинового типа не превышает в среднем

4—6 дней, то в организме человека она сохраняется много месяцев. Кроме того, исходя из количества клеток, необходимых для возникновения данного феномена, и площади наружных кожных покровов, нельзя не прийти к выводу, что число лейкоцитов, необходимое для пассивной сенсibilизации животных, заметно больше того, которое вызывает пассивную аллергию у человека. Уместно подчеркнуть и тот факт, что контакт лейкоцитов сенсibilизированного лица со специфическим аллергеном (туберкулином) приводит к потере «фактора переноса», в то время как лейкоциты морской свинки в этих же условиях (инкубация при 37° в течение 2 ч) полностью его сохраняют. В еще большей мере различия между человеком и животными проявляются при воспроизведении гиперчувствительности немедленного типа.

Для понимания такого рода различий важное значение приобретают исследования по сравнительной морфологии лейкоцитов млекопитающих. Эта проблема в 1945 г. привлекла внимание А. А. Заварзина, который привел доказательства существования двух типов белого кроветворения: агранулоцитарного и гранулоцитарного. По материалам Г. К. Хрущева (1949), первый из них сочетается с наличием малодифференцированной рыхлой соединительной ткани. Второй тип возникает «на базе» высокодифференцированной рыхлой соединительной ткани. Преобладание при этом зернистых лейкоцитов не является случайным признаком, а связано с возникновением усложненной специализации. Между этими типами встречаются промежуточные формы. Из всех млекопитающих гранулоцитарный тип белого кроветворения свойствен только приматам, отряду собак и кошек. Преобладание же незернистых элементов характерно для групп, развившихся в результате эволюции из первичных млекопитающих и первичных плацентарных (сумчатые, парнокопытные грызуны). Непарнокопытные грызуны занимают промежуточное положение. Мы подчеркнули это обстоятельство в связи с тем, что в литературе еще нередко встречаются попытки механического переноса закономерностей, полученных при изучении аллергии в эксперименте на лабораторных животных, в область патологии человека.

Современные представления об участии аллергических процессов в патологии человека дают основание, по мнению А. Д. Адо (1970), выделить три основные категории заболеваний.

Собственно аллергические заболевания. К их числу в первую очередь относится группа истинных аллергических болезней. Последние характеризуются реакциями, реализация которых сопряжена с участием основного иммунологического механизма. По локализации они могут быть системными (коллагенозы), органными или тканевыми (феномен Артюса, отек Квинке). Поступление аллергена в организм специфически сенсibilизированных людей приводит к возникновению немедленных (химергических) или замедленных (китергических) реакций. Максимальная выраженность аллергической реакции в целостном организме определяется как анафилактический шок, который чаще всего развивается на фоне гиперчувствительности немедленного типа. Различают легкий (анафилактоидная реакция), средний, тяжелый и смертельный шок.

Заболевания, в патогенезе которых аллергический компонент является обязательным, а при некоторых клинических формах процесса приобретает ведущее значение. В первую очередь к ним относятся туберкулез, ревматизм и бруцеллез. Последний являлся моделью изучения инфекционной аллергии в многолетних исследованиях сотрудников И. Л. Кричевского — А. Т. Кравченко и Н. В. Галановой (1948). При этом было показано (А. Т. Кравченко, 1938), что состояние инфекционной аллергии не снимается после анафилактической реакции, «проделанной» изолированным органом. При указанных процессах преобладают реакции, характерные для гиперчувствительности замедленного типа. Их выраженность весьма редко достигает силы анафилактического шока. Последний бывает обычно связан с многократным введением высоко-сенсibilизированным больным неправильно подобранных доз аллергена.

Один из таких случаев мы наблюдали в клинике туберкулеза, когда больной со специфическим поражением брюшины неоправданно часто производилась оттитровка высоты туберкулинового титра с помощью проб Манту. Спустя 10 ч после очередной внутрикожной пробы у больной возник озноб, температура достигла 39°, увеличились и стали болезненными периферические пакеты лимфатических узлов. Были зарегистрированы падение кровяного давления, непроизвольное мочеиспускание. Обратил на себя внимание факт анамнестической вспышки местных реакций на туберкулин по всем кожным зонам, на которых

ранее (за 1—3 года до этого) уже ставились туберкулиновые пробы. На этих участках (плечи и предплечья рук, кожа не передней поверхности бедер) возникли ярко-красные крупные сливающиеся инфильтраты.

Группа хронических заболеваний (гипертоническая или язвенная болезнь и др.), при которых аллергический компонент не является обязательным, однако при определенных условиях может возникать и влиять на динамику основного процесса или характер сопряженных с ним осложнений.

К настоящему времени уже накопились материалы, указывающие на возможность возникновения повышенной чувствительности лейкоцитов (в первую очередь лимфоцитов) крови в отношении многих веществ антигенной природы. Охарактеризованы биохимические изменения, возникающие в этих элементах в их фило- и онтогенезе с позиций обеспечения адаптивного эффекта на различные воздействия внешней среды. Оказалось, что характер изменений на молекулярном уровне в ответ на действие повреждающих факторов обычно отличается стереотипностью (В. Я. Александров, 1959). Этот факт, однако, не уменьшил интереса к поставленным цитоэкологией вопросам, поскольку именно в этом направлении могли быть получены материалы, раскрывающие механизм специфических клеточных реакций на антиген. По мнению А. Л. Шабаша (1959), особая ценность информации, накапливаемой при сопоставлении цитологических и гистохимических исследований, состоит в приближении биологии к расшифровке взаимосвязи между клеточными структурами и обменом веществ. Для решения последней задачи широкое применение получили методы иммунофлюоресценции и гистохимии.

Говоря о механизме повреждения антигеном сенсibilизированных лейкоцитов крови, следует указать, что он все еще остается недостаточно изученным. При объяснении данного феномена исследователи не исключают ни одну из следующих гипотез: 1) клетка поражается как носитель внутриклеточных антител или фиксированных на ней сывороточных антител; 2) клетка поражается как носитель антигена; 3) поражение клетки сопряжено с циркуляцией IgE, фиксирующегося на базофилах и других мишенях; 4) клетка поражается высокоагрессивными продуктами, образующимися в результате взаимодействия белков орга-

низма и антигена. Реальность последнего допущения иллюстрируют работы, направленные на изучение вирусиндуцированных антигенов (А. Д. Адо, 1961, и др.).

Каждая из этих гипотез исходит из твердо установленного факта о возможности специфического разрушения циркулирующих лейкоцитов аллергеном. Представления о значении лейкоцитов в формировании ответных реакций организма на антиген стали более полными после того, как была установлена их роль в продуцировании биологически активных веществ (гистамин, серотонин и др.). Следует указать, что значение тех или иных медиаторов при различных типах аллергических реакций не является однозначным. Так, роль гистамина в реализации проявлений аллергии немедленного типа весьма велика, а при формировании реакций замедленного типа он играет второстепенную роль (Н. Д. Беклемишев, А. А. Тутуров, 1967).

Говоря об условиях, при которых осуществляется реакция лейкоцитов на аллерген, нельзя не отметить то обстоятельство, что один и тот же субстрат антигенной природы (микробные клетки, гельминты и др.), введенный в организм в различных дозировках, вызывает в одних случаях развитие сенсибилизации с проявлениями замедленного типа аллергии, а в других — сочетание замедленного и немедленного типов (Н. Д. Беклемишев, 1968). Н. Д. Беклемишев (1971) указывает, что в условиях эксперимента удается воспроизвести аллергию одного и другого типов к любому белку. На выраженность аллергии замедленного типа влияет очаговость и длительность патологического процесса, а в клинике инфекционных болезней — и внутриклеточная локализация возбудителя.

По мнению Н. В. Медуница (1970), эти различия могут быть связаны также и с фазой аллергического процесса или качественным составом аллергена. И действительно, при использовании аллергенов, приготовленных по методу Андо—Вержиковского для специфической диагностики, у больных бронхиальной астмой в абсолютном большинстве случаев регистрируются аллергические реакции, развивающиеся только по замедленному типу. Этот тип реакций возникал при использовании различных концентраций белка в одной диагностической дозе. В противоположность этому нативные аллергены, приготовленные из отмытых у инактивированных микробных клеток, достаточно часто вызывают у таких больных как замедленные, так и немедленные местные реакции.

Каким должно быть отношение клинициста к патологическому процессу, при котором в ответ на внутрикожную пробу с аллергеном регистрируются обе формы гиперчувствительности? Как такое состояние преломляется в специфических реакциях клеток на аллерген *in vitro*? Ответ на поставленные вопросы могут дать только дальнейшие исследования.

Прежде чем сформулировать основные требования, которые должны быть приняты во внимание при разработке новых и сопоставлении существующих методов изучения аллергии, представляется целесообразным обсудить несколько терминологических вопросов. Для обозначения специфической сенсibilизации организма общепринятым является понятие «аллергия». Однако в отношении основных типов реакций кожи и целостного организма на аллергены читатель встречает в литературе несовпадающие формулировки. Так, реакции, развивающиеся в течение первых 15—30 мин, могут обозначаться как «аллергические реакции немедленного типа», «ранние реакции» или как «гиперчувствительность немедленного типа». Реакции, формирующиеся в большие интервалы времени (18—72 ч), обозначаются как «аллергические реакции замедленного типа», «поздние реакции», «гиперчувствительность замедленного типа». Термины «аллергические реакции замедленного и немедленного типов» чаще используются клиницистами (Halpern, 1969; П. Н. Юренев, 1971, и др.). В работах иммунологического профиля (Chase, 1966; Burnet, 1971, и др.) употребляются преимущественно выражения «гиперчувствительность немедленного и замедленного типов».

Терминологические различия присущи и описанию специфических реакций, связанных с появлением в организме измененных в антигенном отношении собственных тканевых элементов. Патогенез такого рода изменений не всегда ясен. В 1966 г. Boyd высказал предположение, что антигены микробного или лекарственного происхождения воздействуют на организм таким образом, что некоторые компоненты клеток приобретают чужеродные свойства. В последующие годы эта точка зрения нашла свое развитие в многочисленных исследованиях, направленных на установление общих антигенных детерминант между различными патогенными микроорганизмами и тканями макроорганизма (например, между гемолитическим стрептококком и мышечной тканью сердца). Если И. П. Лернер и Е. С.

Брусиловский (1961), Witebsky (1970), С. В. Семенов (1973) и др. применяют для обозначения сенсibilизации к измененным тканевым структурам собственного организма выражения «аутосенсibilизация», «аутоаллергические реакции», то Nossal (1969) и др. используют термин «ауто-иммунитет».

Исходя из того, что в данной монографии рассматриваются прежде всего различные иммунологические реакции клеток на аллергены *in vitro*, мы будем использовать для характеристики специфических сдвигов термины «гиперчувствительность немедленного и замедленного типов». Для обозначения реакций, обусловленных явлениями сенсibilизации к измененным собственным тканям организма, будет употребляться выражение «аутоаллергическая реакция». Неприемлемость выражения «аутоиммунитет» вытекает, с нашей точки зрения, из того обстоятельства, что общебиологический смысл термина «иммунитет» трудно совместить с теми последствиями, которые возникают в результате появления повышенной чувствительности к субстратам аутоантигенной природы. Как отметил Crier (1962), аутоаллергическую реакцию с патогенетической точки зрения следует рассматривать как заболевание, при котором иммунная реакция направлена против собственных тканей вне зависимости от характеристики агента, обусловившего данный процесс.

Рассмотрим требования, которым должны удовлетворять методы изучения аллергии.

1. Специфичность диагностики. Для всех аллергологических тестов специфичность должна характеризоваться высоким процентом положительных результатов у специфически сенсibilизированных лиц и соответственно отрицательными ответами, полученными у практически здоровых людей, не сенсibilизированных к данному аллергену. Необходимо иметь в виду, что при использовании разных серий аллергена выраженность реакций может существенно колебаться в зависимости от концентрации и качества диагностического препарата.

2. Безопасность диагностики. Под безвредностью диагностики следует понимать исключение общих или очаговых реакций, а также отсутствие заметного сенсibilизирующего эффекта, обусловленного введением в организм диагностических доз данного аллергена.

3. Доступность диагностики. Под ней подразумевается не только техническая сторона исполнения пробы в усло-



виях лаборатории: сложность оборудования, простота обнаружения клеток в препаратах и т. д. Когда речь идет о методах исследования *in vitro*, не менее существенно учитывать и пути получения необходимого для диагностики субстрата от больного. Так, тесты, постановка которых требует небольших количеств крови из места прокола кожи пальца, значительно доступнее, чем те, при которых требуется больше крови, причем она должна быть взята из вены.

4. Объективность учета результатов диагностики. Она выражается в хорошо очерченных морфологических или функциональных критериях, позволяющих получать совпадающие результаты при оценке одной и той же пробы разными лабораторными работниками или при повторном просмотре препарата одним и тем же лицом.

5. Скорость диагностики. Она имеет наибольшее значение при выявлении лекарственной и инфекционной аллергии.

6. Адекватность метода задачам диагностики. В качестве примера сошлемся на необходимость разграничения инфекционной аллергии (обусловленной спонтанным внедрением в организм патогенного возбудителя) и аллергии, возникшей в результате проведения специфической вакцинации. Так, известно, что после профилактического внутрикожного введения вакцины БЦЖ выраженность реакции кожи на туберкулин существенно не отличается от таковой у лиц, инфицированных возбудителем туберкулеза. Таким образом, внутрикожные туберкулиновые пробы не пригодны для дифференцировки инфекционной и вакцинальной сенсibilизации организма.

7. Стандартность условий диагностики. Речь идет об обеспечении идентичных технических условий при постановке проб *in vivo* или реакций *in vitro*. При этом использование стандартных по своей активности серий аллергенов является одной из важнейших предпосылок получения стабильных результатов исследования.

## Лейкоциты гранулоцитарного ряда

В периферической крови человека большинство гранулоцитов представлено нейтрофилами. Как следует из формулы Шиллинга, у здоровых людей они составляют от 60 до 70% общего содержания лейкоцитов в периферической

крови. Значительно реже встречаются эозинофилы (2—4%) и совсем редко базофилы. В связи с тем, что эозинофилы крови до последнего времени не нашли применения в специфической диагностике *in vitro*, в настоящем кратком обзоре нет необходимости задерживать внимание читателя на их морфологических и функциональных особенностях.

Нет необходимости обосновывать и тот общеизвестный факт, что кровь является наиболее динамичной средой человеческого организма и не только в плане ее регенераторных возможностей, но и в отношении физико-химической подвижности. Можно лишь заметить, что учет индивидуальных физико-химических свойств крови больного при постановке специфических реакций лейкоцитов на аллерген никем не производился и значение этого фактора остается невыясненным. Между тем результаты экспериментальных работ позволяют считать, что такого рода особенности способны влиять на реактивность клеточных элементов.

В соответствии с унитарной теорией кроветворения, получившей наибольшее признание, гранулоциты возникают из гемоцитобластов в стадии ангиобластического кроветворения. Начиная с периода эмбрионального кроветворения местом их образования является костный мозг. Цитоплазма, занимающая большую часть клетки, имеет специфическую нейтрофильную зернистость, отличающуюся от зернистости остальных гранулоцитов (эозинофилов или базофилов). Зернистость чаще всего находится в состоянии броуновского движения, отчетливо обнаруживаемого в условиях фазово-контрастной микроскопии. Различают палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы. Как указывают И. А. Кассирский и Г. А. Алексеев (1970), степень дольчатости ядра не может служить признаком его старения или дегенерации, а отражает процесс созревания. По данным ряда работ, время созревания гранулоцита составляет 2 сут. Однако их поступление в кровь может быть отсрочено на несколько дней. Уместно подчеркнуть, что число гранулоцитов в костном мозге более чем в 25 раз превышает их количество в крови. В условиях патологического состояния (инфекционный или воспалительный процесс) количество лейкоцитов в крови, и прежде всего нейтрофилов, возрастает в несколько раз.

По наблюдениям С. А. Троицкого и З. Г. Филюшиной (1963), срок циркуляции нейтрофилов в кровеносных сосу-

дах составляет приблизительно 30 мип, после чего они задерживаются в тканях внутренних органов. Donner (1960) отмечает пять стадий в жизненном цикле лейкоцитов: а) созревание до выхода в кровь, б) циркуляция в крови, в) выход из кровяного русла, г) задержка в отдельных тканях, д) потеря функциональной активности и разрушение. В разрушении или смерти клетки Bessis (1964) различает три фазы: 1) период патологии; под ним подразумевается время, в течение которого устранение повреждающего фактора способно восстановить жизнеспособность клетки. Обычно в этих случаях в большей или меньшей степени повреждаются внутриклеточные мембраны; 2) период смертельной агонии, которая начинается после перехода периода патологии в состояние необратимых изменений; 3) собственно смерть клетки, нарушение ее целостности; в настоящее время установлено, что гибели клеток предшествуют этапы кислородной недостаточности и анаэробного гликолиза, в клетках снижается рН, происходят освобождение и активация протеолитических ферментов (Policard, 1970).

Среди всех лейкоцитов нейтрофилы отличаются наибольшей скоростью движения. У здоровых лиц она колеблется в пределах 18—43 мм в минуту. При возникновении в организме воспалительных процессов скорость движения гранулоцитов возрастает. Эта же функциональная особенность нейтрофилов отчетливо проявляется и при постановке ряда специфических реакций *in vitro*. Если исследовать скорость миграции полинуклеаров из капилляра в среду, в которую внесен аллерген или антиген, то окажется, что уже через 1½ ч клетки обнаруживаются в значительном количестве вне капилляра. (Хорошо выраженная миграция мононуклеаров регистрируется не ранее чем через 5 ч).

Еще быстрее нейтрофилы сенсibilизированного лица отвечают на аллерген усилением амебоидной активности, которая начинает резко нарстать уже спустя 10—20 мин после внесения аллергена в кровь. Нужно подчеркнуть, что изучение механизма амебоидной активности клеток уже давно привлекало внимание цитологов. Было очевидно, что изучение механизма амебоидной активности сопрягается с проблемами внутриклеточного движения протоплазмы. Высказывались предположения, что принципы движения протоплазмы фагоцитов соответствуют аналогичным явлениям у амёб, у которых протоплазма представлена двумя слоями: наружным, обладающим высокой вязкостью

и находящимся в состоянии геля, и более жидким внутренним (золь), способным быстро перемещаться, за счет чего и строятся псевдоподии. Допускалось, что под влиянием повышенного гидростатического давления со стороны плазмозоля наружный, гелевый, слой способен разжижаться. В последние десятилетия наибольший интерес исследователи проявляли к изучению так называемых актомиозиноподобных белков, которые в больших или меньших количествах, по-видимому, присутствуют в любых клетках и при взаимодействии с АТФ обуславливают их двигательные реакции и тонус. Обширная информация по этому вопросу содержится в монографии Б. Ф. Поглазова «Структура и функция сократительных белков» (1965).

По сравнению с остальными формами лейкоцитов нейтрофилы характеризуются наибольшей фагоцитарной активностью и соответственно наиболее сложной ферментной системой, обеспечивающей интенсивное внутриклеточное переваривание фагоцитированных объектов. По мнению Н. Д. Беклемишева (1971), объекты диаметром 10 мкм соответствуют наибольшим размерам фагоцитируемых нейтрофилами крови частиц. В условиях заверщенного фагоцитоза речь идет о взаимодействии ряда ферментных систем. В 1955 г. в лаборатории de Duve в клетках печени крыс были выявлены органеллы, названные лизосомами. Вскоре они в значительном числе были обнаружены в макрофагах и нейтрофилах. Если первоначально в лизосомах было идентифицировано лишь 5 ферментов (кислая фосфатаза, кислая РНК-аза, кислая ДНК-аза,  $\beta$ -глюкуронидаза и катепсин), то к 1969 г. это число возросло до 36 (см. обзор Н. Т. Райхлина, 1971). Таким образом, речь идет о высокоспециализированном «пищеварительном тракте», обладающем высокой переваривающей активностью. Нейтрофилы содержат набор ферментов, с помощью которых может быть осуществлено расщепление практически любого биологического субстрата, попавшего в клетку. По завершении эндоцитоза (втягивание объекта фагоцитоза внутрь клетки) образуется фагосома, которая, «отторгаясь» от наружной мембраны в сторону углубленных участков цитоплазмы, сближается с лизосомой и сливается с ней. В процессе фагоцитоза лизосомальные гранулы исчезают. Поскольку нас в дальнейшем будет интересовать механизм повреждения сенсibilизированных нейтрофилов специфическим антигеном, не лишне привести остроумное замечание de Duve о том, что в лизосомах содержится все необхо-

димое для самоуничтожения клетки. Следует подчеркнуть, что, по данным ряда авторов, различия в лизосомальных ферментах гранулоцитов и лейкоцитов мононуклеарного ряда носят не только количественный, но и качественный характер (Tanaka, Valentine, Fredricks, 1962, и др.).

Экспериментальными работами Henson (1971) и др. было показано, что выделение из лизосом кислой и щелочной фосфатаз,  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -галактозидазы и кислых катепсиназ происходит в процессе активной фагоцитарной реакции.

При контакте с комплексом антиген — антитело, адсорбированным на поверхности миллипорового фильтра, нейтрофилы кролика не лизировались, но выбрасывали во внеклеточную среду ферменты. Некоторые из них (щелочная фосфатаза) вторично адсорбировались на наружных мембранах клетки и не диффундировали. В ходе эксперимента имела место гибель незначительного числа нейтрофилов, что регистрировалось тестами на жизнеспособность (окраска трипановым синим, проба на активность лактатдегидрогеназы).

Еще одной функцией полиморфноядерных лейкоцитов, пока недостаточно изученной, является пиноцитоз. Речь идет о механизме активной доставки жидких веществ из внешней среды внутрь клетки путем впячивания мембран. Приравнивание пиноцитоза к фагоцитозу, по мнению Rolicard (1970), является не более чем образным выражением, так как инвагинация мембран происходит при более высоком внутриклеточном давлении (по отношению к внешней среде), и по своей направленности данный феномен противоположен образованию микроворсинок и выбросу псевдоподий.

Морфологические изменения в нейтрофилах при неблагоприятных условиях среды *in vitro* появляются сравнительно быстро (рис. 1). Они выражаются в пикнозе и фрагментации ядра. Пикноз бывает частичным (захватывает отдельные сегменты ядра) или генерализованным. Более выраженные некробиотические изменения ядер определяются как кариорексис. В процессе кариорексиса ядро распадается на отдельные глыбки, чаще округлой формы, вплоть до мелкой зернистости. Иногда кариорексис сочетается с пикнозом ядра. В ядрах нейтрофилов могут обнаруживаться различной степени хроматинолиз и гипохроматоз. В случаях хроматинолиза в ядре исчезает (как бы растворяется) структура глыбок и нитей,

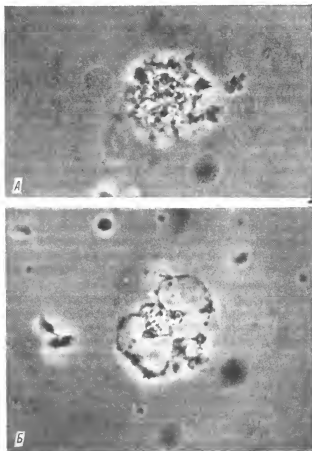


Рис. 1. Дегенеративные изменения (А) и завершающийся лизис гранулоцита (Б) в камере с жидкостью фазово-контрастного микроскопа.

Как уже отмечалось, базофилы в крови здоровых людей встречаются редко, составляя примерно 0,5% от общего числа лейкоцитов периферической крови. При просмотре лейкоцитов в счетной камере число базофилов у взрослых составляет 30—40 в  $1\text{ мм}^3$ . Количество их у детей значительно больше — до 3—6%. Протоплазма базофилов наиболее отчетливо заметна в неокрашенном состоянии. Она

заполнена разноразмерными зернами, которые обнаруживаются и на поверхности ядра. Ядро клетки чаще всего имеет 3—4 широкие лопасти, хотя встречаются и ядра кругло-овальной формы или с односторонним глубоким вдавлением. Диаметр базофилов колеблется от 8 до 10 мкм. Несмотря на то что базофилы, как и нейтрофилы, объединяются в одну категорию гранулоцитов, их функциональная характеристика во многом не совпадает. В то время как нейтрофилы отличаются высокой фагоцитарной активностью, фагоцитоз со стороны базофилов не обнаруживается совсем или наблюдается крайне редко. В отличие от нейтрофилов базофилы не отличаются заметной подвижностью.

Работами Valentine с сотр. (1955) и других авторов было установлено, что, кроме гепарина, плазминогена, активаторов фибринолиза, в базофилах содержится в значительном количестве и гистамин. Синтез гистамина в базофилах осуществляется путем декарбоксилирования гистидина при участии гистидиндекарбоксилазы. Способность базофилов синтезировать и выбрасывать в кровь значительные количества гистамина обуславливает четкую корреляцию между функциональной активностью этих элементов и выраженностью аллергических реакций. Специфической сенсibilизации организма сопутствует повышение количества базофилов в периферической крови. Непосредственно после выраженных аллергических реакций число циркулирующих базофилов заметно снижается. В этом проявляется более общая закономерность: усложненная рецепторная восприимчивость и насыщенность медиаторами обуславливает незамедлительную реакцию базофилов на разнообразные воздействия факторов внешней или внутренней среды.

Завершая обсуждение общих вопросов, относящихся к функциям гранулоцитов, мы подчеркиваем, что их участию в специфических иммунологических реакциях до последнего времени не уделялось достаточного внимания. В наибольшей мере это относится к полиморфноядерным лейкоцитам. В самом деле, даже в таких фундаментальных руководствах, как «Основы иммунологии» (Boyd, 1966) и «Клеточная иммунология» (Burnet, 1969), нейтрофилам крови не было уделено ни одного раздела. Между тем, признавая роль фагоцитарной реакции нейтрофилов в формировании иммунологической реактивности организма, нет никаких оснований отказываться от выяснения механизма

взаимодействия этих элементов с агранулоцитами. Необходимость такого рода исследований очевидна.

До настоящего времени использование в аллергологии специфических реакций нейтрофилов на аллергены инфекционного и неинфекционного происхождения шло по двум основным направлениям: 1) оценка амeboидной активности нейтрофилов по Фрадкину, 2) оценка внутриклеточных некробиотических изменений.

## Лейкоциты агранулоцитарного ряда

В периферической крови к лейкоцитам агранулоцитарного ряда относятся лимфоциты и моноциты. Если лимфоциты в силу их заметного и высококомпетентного участия в формировании реакций иммунитета и аллергии постоянно находятся в центре внимания большого числа специалистов теоретических и прикладных дисциплин, то клетки моноцитарного ряда изучаются не столь интенсивно. В последнее время внимание исследователей привлекают факты преимущественного присутствия моноцитов в инфильтратах, вызванных введением аллергена при гиперчувствительности замедленного типа, и наличия на поверхности моноцитов специфических рецепторных участков для некоторых типов человеческих гамма-глобулинов. Учитывая, что методы диагностики аллергии *in vitro* связаны прежде всего с регистрацией реакции лимфоцитов крови, мы несколько подробнее рассмотрим ряд вопросов, затрагивающих функции этих элементов.

При изучении морфологии лимфоцита внимание прежде всего сосредоточивается на ядре. Как правило, оно имеет центральное расположение и окружено поясом протоплазмы. В связи с существенными различиями в ширине этого пояса гематологи нередко говорят о широкопротоплазматических и узкопротоплазматических лимфоцитах. Некоторые исследователи идут в этом направлении значительно дальше. Torelli с сотр. (1963) в результате максимальной детализации морфологических особенностей лимфоцитов крови считают возможным разграничить их на семь типов, каждый из которых отличается не только шириной цитоплазматической зоны, но и особенностями рисунка хроматина, расположением и структурой ядра. Лимфоциты в кровяном русле имеют сферическую форму, диаметр их равен 6 мкм, площадь поверхности — 113 мкм.



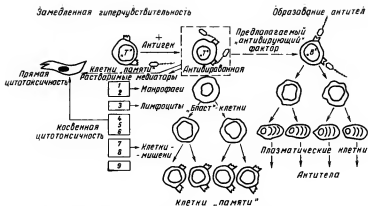


Рис. 2. Взаимосвязь лимфоцитов Т- и В-линий и их роль в проявлении аллергии замедленного типа и образования антител (по Bloom и Glade, 1971).

1— фактор подавления миграции; 2— фактор хемотаксиса; 3— фактор подавления бластогенеза; 4— лимфотоксин; 5— фактор подавления вегетативного размножения; 6— фактор подавления пролиферации; 7— интерферон; 8— антитела; 9— кожнореактивный фактор.

Молекулярные компоненты поверхности лимфоцитов неоднородны и состоят не менее чем из пяти типов функциональных групп: SH-группы;  $\alpha$ -карбоксильные группы N-ацетилнейраминной кислоты, чувствительные к нейраминидазе; фосфатные группы, чувствительные к РНК-азе неидентифицированные кислотные группы. Не менее сложен и ферментный состав лимфоцитов. В нем обнаруживается группа окислительно-восстановительных ферментов энергетического обмена, имеются лизосомальные ферменты и т. д. Двигательная функция лимфоцитов не носит целенаправленного характера. Однако в тех случаях, когда в непосредственной близости от них появляется клетка, лимфоциты активно перемещаются в ее сторону и посредством цитоплазматического мостика соединяются с ней. Дегенеративные изменения лимфоцитов проявляются в виде пикноза, кариорексиса и вакуолизации ядра. Изменения в протоплазме обычно регистрируются лишь в стадии цитолиза.

Исследования последних лет с несомненностью установили, что циркулирующие в крови лимфоциты состоят из нескольких морфологически неразличимых линий, существенно отличающихся друг от друга по своим иммунологическим свойствам (рис. 2). Линия так называемых

В-лимфоцитов (в процессе своей дифференцировки они не проходят миграцию через вилочковую железу) имеет непродолжительный жизненный цикл. В процессе рециркуляции они перемещаются в фолликулы селезенки и лимфатических узлов, а также в красную пульпу селезенки и мякотные шнуры лимфатических узлов. Под влиянием иммунизации после латентного периода в пределах 20 ч скорость пролиферации В-лимфоцитов резко возрастает (время удвоения числа клеток около 12 ч). Элементы этой линии дифференцируются в плазматические клетки. Допускается, что возможность секреции антител сопряжена с наличием на участках наружных мембран иммуноглобулинов, обеспечивающих распознавание антигена и специфическую ответную реакцию. Установлено, что часть циркулирующих лимфоцитов отличается от обычных малых лимфоцитов признаками активации белкового синтеза.

Вторая основная линия лимфоцитов представляет собой тимусзависимые клетки (Т-клетки). Часть лимфоцитов из циркуляции задерживается в вилочковой железе (условия их «отбора» остаются нерасшифрованными). Эти лимфоциты подвергаются определенному воздействию, вследствие чего появляются элементы с новыми свойствами. Клетки вилочковой железы, полученные из сенсibilизированного организма, не повреждаются антигеном. Они обуславливают клеточный иммунитет и непосредственно не участвуют в выработке антител. Одна из субпопуляций Т-лимфоцитов (Т<sub>2</sub>-клетки) отличается удлинённым (до нескольких лет) жизненным циклом, и ряд исследователей склонны видеть в ней иммунокомпетентную часть популяции. Под влиянием иммунизации пролиферация Т-лимфоцитов заметно усиливается и достигает максимума на 4–5-е сутки. Имеются указания на то, что увеличение популяции Т-клеток происходит в результате воздействия значительно меньших доз антигена по сравнению с теми, которые необходимы для достижения максимальной продукции антител. Как отмечено в редакционной статье о лимфоцитах журнала «Lancet» (1973), в крови людей содержится около 34% В-клеток и около 66% Т-клеток.

Несмотря на то что Т-клетки не вырабатывают антитела, они являются важным звеном в механизме иммуногенеза. В соответствии с гипотезой Kreth и Williamson (1971), присутствие Т-клеток обуславливает стимуляцию В-клеток. Это обстоятельство позволило И. Л. Черткову и А. Я. Фриденштейну (1972) поддержать мнение, что

причисление к антигенчувствительным клеткам лишь тех элементов, которые реагируют на антиген продукцией антител, не является правомерным: в условиях изоляции ни одна из двух популяций лимфоцитов (Т-клетки и В-клетки) не способна ответить на контакт с антигеном образованием антител. По этой причине предлагается обсуждать вопросы иммуногенеза с учетом антигенчувствительных единиц, включающих кооперацию Т- и В-лимфоцитов.

Воздействие Т-лимфоцитов на В-лимфоциты может осуществляться либо посредством образования между ними специального мостика, либо при прямом контакте поверхностей двух элементов. Kreth и Williamson (1971) допускают, что в результате реакции В-лимфоцита с антигеном поверхность клетки несколько видоизменяется и это улавливается Т-лимфоцитом. Взаимодействие двух линий лимфоцитов приводит к стимуляции В-клеток (см. рис. 2). В последнее время все большее распространение получило мнение о влиянии на функцию лимфоцитов «нейтральных» в иммунном отношении элементов. Так, А. Я. Фриденштейн (1973), разработав метод длительного культивирования отдельных линий клеток стромы, создающих специфическое микроокружение в лимфоидных органах, пришел к выводу об их существенном влиянии на процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Из сенсibilизированных лимфоцитов можно получить ряд растворимых факторов, оказывающих определенное воздействие на другие клеточные элементы: фактор переноса, фактор, подавляющий миграцию макрофагов, фактор трансформации, лимфотоксин. По своим биологическим свойствам и качественным характеристикам перечисленные факторы существенно отличаются друг от друга. Так, лимфотоксин образуется в процессе стимуляции лимфоцитов антигеном или неспецифическим стимулятором фитогемагглютинином (ФГА). Он термостабилен, не диализуется и имеет молекулярный вес около 90 000. В присутствии лимфотоксина наблюдаются выраженные цитотоксические изменения в различных клетках-мишенях. В противоположность этому молекулярный вес фактора переноса не превышает 10 000 (Craddock, Longmire, McMillan, 1971). Фактор содержится в цельных клетках и может переходить в надосадочную жидкость при их замораживании и оттаивании. Фактор растворим, хорошо диализуется и резистентен к действию панкреатической РНК-азы. На этом примере особенно отчетливо проявляются трудно-

сти, с которыми сталкиваются исследователи, выясняющие механизм пассивной аллергии. Столь незначительный молекулярный вес фактора переноса указывает на то, что речь может идти не об альбумине или гамма-глобулине, а о полипептидно-полинуклеотидном комплексе. Данный комплекс *in vivo* или *in vitro* переводит лимфоциты нормального реципиента в состояние повышенной чувствительности к антигену, использованному для сенсибилизации организма донора, хотя сам он не обладает иммуногенностью и к категории антигенов причислен быть не может. Высокая активность и быстрое действие фактора переноса (оно начинает проявляться уже спустя несколько часов) позволяют рассматривать его как специфический медиатор, природа которого остается невыясненной. Важно указать, что, по наблюдениям Lawtence (1971), попытка нейтрализовать фактор переноса при помощи специфического аллергена оказалась неудачной. Строма лимфоцитов после экстракции фактора теряла способность к пассивному переносу аллергии. Все сказанное позволило автору поставить вопрос о воспроизведении с помощью фактора переноса гиперчувствительности замедленного типа в «чистом» виде (без синтеза антител).

Вопросы воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа в «чистом» виде постоянно привлекают внимание исследователей, видящих в этом возможность углубить представление о ее механизме. Н. В. Медуницин (1970) провел исследование, цель которого состояла в изучении транзиторной аллергии в условиях сенсибилизации к растворимым белкам. С такой формой гиперчувствительности замедленного типа приходится сталкиваться при использовании биологических препаратов, относящихся к анатоксинам и гамма-глобулинам. Получив в экспериментальных условиях специфическую замедленную форму аллергии к человеческому гамма-глобулину, Н. В. Медуницин отметил, что в течение первых 2 нед с момента сенсибилизации животных циркулирующие антитела отсутствовали, хотя проявления замедленной гиперчувствительности к антигену были налицо. Разумеется, мы далеки от мысли провести полную аналогию между «чистой» замедленной гиперчувствительностью, вызываемой фактором переноса, и начальными проявлениями транзиторной аллергии. Речь идет лишь о том, что сенсибилизация по замедленному типу (в той форме, в какой она учитывается аллергологами при постановке кожных проб) представляет,

по-видимому, неоднородный по своему иммунологическому механизму феномен.

Использование лимфоцитов крови в качестве тест-объекта для оценки специфической сенсибилизации организма развивалось с использованием двух основных реакций: 1) лейколиза, 2) бласттрансформации.

## Глава 2

### ПОКАЗАТЕЛЬ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ПО ФРАДКИНУ (ТЕСТ ППН)

---

Предпринимая попытку использовать нейтрофилы в целях специфической диагностики *in vitro*, автор исходил не из морфологических, а из функциональных особенностей, присущих этим элементам. Речь идет об амебоидной активности лейкоцитов, которую они проявляют в жидкой среде и без видимой связи с каким-либо воздействием. Наиболее часто амебоидная активность выражается в появлении нескольких небольших и сравнительно узких выпячиваний типа псевдоподий или одной или двух более широких лобоподий (рис. 3, см. на цветной вклейке между стр. 32—33). Наблюдая нейтрофилы в камере с жидкостью методом фазово-контрастной микроскопии, не трудно заметить, что при отсутствии специфически раздражающих факторов клетки обычно находятся в состоянии сферической формы. Последняя характеризуется лишь незначительными колебательными движениями наружной клеточной мембраны. В условиях инкубации крови сенсибилизированного больного со специфическим аллергеном амебоидная активность нейтрофилов становится весьма интенсивной. Длина их псевдоподий может в несколько раз превышать диаметр клетки. В известных пределах на интенсивность амебоидной реакции могут влиять и физические факторы. Еще в 1869 г. Н. Я. Чистович указал, что при температуре 36—37° амебоидная реакция происходит более вяло, чем при 38—40°.

Обсуждая характер изменений нейтрофилов при их взаимодействиях с аллергеном *in vitro*, необходимо прежде всего обосновать использованный нами термин «показатель повреждения нейтрофилов». Многолетними исследо-

ваниями Д. Н. Насонова и его школы (Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, 1940, и др.) был установлен ряд фактов, имеющих общепатологическое значение. Изучая изменения компонентов протоплазмы при различных воздействиях (механических, температурных, химических и др.), авторы описали комплекс стереотипных ответных реакций клеточных элементов, обозначенный как паранекроз. Глубина паранекротических сдвигов определялась силой действующего раздражителя. Характерным признаком начальной стадии повреждения элементов являлась хорошая обратимость возникавших внутриклеточных изменений. Именно эта обратимость отличала состояние паранекроза от необратимых некротических изменений. Эти факты легли в основу дальнейших представлений о повреждении клеток, начальными стадиями которого являются нарушения их функциональной активности, физико-химические и биохимические изменения (А. Д. Браун, 1966). В этой связи для характеристики начальных стадий реакций нейтрофилов крови сенсibilизированного лица на специфический аллерген и был использован термин «показатель повреждения нейтрофилов».

Учитывая перечисленные выше функциональные особенности нейтрофилов, включая и возможность усиления фагоцитоза в результате предшествующей вакцинации, и были проведены исследования (В. А. Фрадкин, 1962), в ходе которых определялась частота амeboидной реакции при инкубации крови в смеси с аллергеном. Реакция оценивалась в мазках крови. Сравнительное изучение разных методов обработки (окраски) мазков выявило целесообразность применения комбинированного метода: постановки гистохимической реакции на гликоген по А. Л. Шабадашу (1959) с докраской ядер клеток гематоксилином. При этом в условиях иммерсионной микроскопии препаратов крови нейтрофилы имели вид клеток, в которых цитоплазма окрашивалась в сплошной красный цвет, а ядро — в синий или фиолетовый. Несомненные преимущества такой обработки мазков заключались в том, что эритроциты (они не содержат видимых гранул гликогена) не окрашивались и все категории лейкоцитов легко обнаруживались на светлом фоне. Заслуживала внимания и четкость дифференцировки самих элементов белой крови, поскольку в лимфоцитах и моноцитах видимые гранулы гликогена также отсутствуют или встречаются в незначительных количествах. По этой причине лимфоциты и моноциты регистрируются

лишь по сине-фиолетовому ядру и слабо очерченным контурам цитоплазмы. От остальных лейкоцитов легко отличить и эозинофилы с характерной конфигурацией ядра и своеобразным тонкостяжистым расположением гранул гликогена.

Однако наиболее существенное достоинство примененной обработки мазков крови вытекает из простоты обнаружения в полинуклеарах амебоидной активности, которая, как правило, сопровождается отчетливым перераспределением внутриклеточного гликогена. Последний в повышенных концентрациях накапливается в псевдоподиях и прилежащих к ним зонах. Все перечисленные обстоятельства позволяют не только быстро и безошибочно обнаруживать нейтрофилы крови в мазке, но и регистрировать их реакцию на аллерген.

Другая методическая задача, которую следовало решить, состояла в установлении оптимального срока инкубации крови в смеси с аллергеном. Специальные опыты показали, что в случае использования крови сенсibilизированных больных повышенная амебоидная реакция нейтрофилов на специфический аллерген при 38° возникала уже спустя 15 мин. Однако в части случаев она продолжала нарастать и между 1 и 2 ч держалась примерно на одном уровне. Исходя из всей совокупности наблюдений, мы решили, что оптимальным (для ряда бактериальных аллергенов) является инкубирование в течение 2 ч. В течение этого периода амебоидная реакция нейтрофилов на неспецифические условия среды (инкубация контрольной порции крови в смеси с антикоагулянтом — цитратом натрия) продолжала оставаться незначительной (число реагирующих клеток в пределах 10%). Разумеется, не исключено, что для какого-либо аллергена оптимальное время инкубирования окажется равным 30 или 90 мин.

Оценка разнообразных пространственных условий, сопутствующих регистрации псевдоподий в мазке крови, и результатов учета их величины в разных препаратах у одних и тех же лиц позволила сделать вывод, что этот признак не должен приниматься во внимание. В самом деле, если основание псевдоподии оказалось на стороне клетки, прилежащей к стеклу, то на зафиксированном мазке мы можем обнаружить лишь незначительно выступающий ее край. Помимо этого, оценка амебоидной реакции с позиций «есть» или «нет» позволяет избегать дополнительных субъективных наслоений, которые сопутствуют

Таблица 1

Результаты параллельного подсчета 100 и 200 нейтрофилов в мазках крови с различным уровнем реакции клеток на аллерген

Характеристика реакции нейтрофилов	Порядковый № исследования	Поврежденные нейтрофилы (%)		Разница %
		при подсчете первых 100 клеток	при подсчете 200 клеток	
Повышенная и высокая эозинофильная активность	1	44	44	0
	2	24	21,5	-2,5
	3	24	27,5	+3,5
	4	23	20	-3
	5	19	20	+1
	6	40	43	+3
	7	20	19	-1
	8	58	56	-2
	9	25	30	+5
	10	21	18	-3
	11	27	27	0
	12	30	28,5	-1,5
	13	18	18,5	+0,5
	14	32	29,5	-2,5
Низкая эозинофильная активность	1	1	3	+2
	2	2	2	0
	3	6	6	0
	4	2	2,5	+0,5
	5	3	2,5	-0,5
	6	4	2	-2
	7	3	3,5	+0,5
	8	2	1,5	-0,5
	9	10	9,5	-0,5
	10	3	3	0

количественным критериям («больше» или «меньше»), определяемым визуально.

Один из первоочередных вопросов состоял в установлении числа нейтрофилов, реакцию которых нужно оценить для получения достоверного результата исследования. Известно, что при подсчете формулы белой крови, где все элементы делятся на семь категорий (базофилы, эозинофилы, юные, палочкоядерные и сегментоядерные формы нейтрофилов, лимфоциты и моноциты), рекомендуется сосчитывать 200 клеток (В. Е. Предтеченский, Е. А. Кост, Л. Г. Смирнова, 1964).

В наших исследованиях в мазке крови подсчитывались лишь нейтрофилы, которые делились только на две катего-



рии: нормальные и поврежденные. По этой причине можно было рассчитывать на получение достаточно стабильных результатов при подсчете 100 элементов. Для проверки этого положения в мазках, приготовленных из крови 14 больных туберкулезом легких с высокими значениями реакции нейтрофилов на туберкулин, было сосчитано по 200 нейтрофилов с отметкой результатов после учета каждых 100 клеток (предварительно кровь в течение 2 ч инкубировали в смеси с туберкулином).

Результаты подсчета показали (табл. 1), что при просмотре 200 клеток у больных туберкулезом с выраженной чувствительностью нейтрофилов к туберкулину начальный результат, полученный при подсчете 100 клеток, изменялся незначительно. Максимальное отклонение (в одном случае из 14) равнялось 5%. Как следует из формулы определения величины ППН (см. ниже), такое расхождение составит величину 0,05 и окажется несущественным для результатов диагностики у лиц с высокой чувствительностью нейтрофилов к аллергену. Следовало полагать, что разница в числе реагирующих нейтрофилов при просмотре 100 и 200 клеток в контролях или у лиц с невысокой чувствительностью к аллергену должна быть соответственно меньше. И действительно, максимальные расхождения в этих случаях не превысили 2%.

На основании изложенного было признано достаточным оценивать реакцию нейтрофилов на аллерген путем подсчета 100 клеток.

При использовании любого аллергена приходится решать вопрос о его оптимальной рабочей концентрации. За такую концентрацию следует принимать дозу препарата, которая обусловит интенсивную амебоидную реакцию нейтрофилов, полученных от высокосенсибилизированного лица, и не вызовет выраженной активности клеток здоровых (несенсибилизированных или слабо сенсибилизированных) людей.

Рассмотрим в качестве примера выбор дозы туберкулина. Данный аллерген выпускается в трех формах: жидкий альттуберкулин Коха, сухой очищенный туберкулин и стандартные разведения сухого очищенного туберкулина для кожных проб. Использование альттуберкулина нецелесообразно, поскольку в его состав входят неспецифические компоненты и это не может не усложнить условия контроля реакции. Кроме того, при использовании жидких аллергенов значительно труднее установить оптимальную рабо-

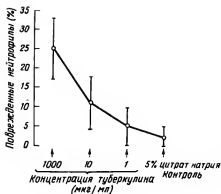


Рис. 4. Повреждаемость нейтрофилов различными концентрациями аллергена — туберкулина (тест ППН).

чую дозу для теста *in vitro*, так как отсутствует возможность использовать концентрацию выше той, которую содержит уже приготовленный для диагностики аллерген. По этой причине для работы был применен сухой очищенный препарат. В условиях обследования 30 больных туберкулезом легких были одновременно апробированы три следующих разведения аллергена: цельный препарат (содержимое ампулы растворяется в 1 мл 5% цитрата натрия) и препарат, разведенный 5% цитратом натрия в 100 и 1000 раз. Как видно на рис. 4, наибольшее повреждающее действие оказывал цельный раствор. После установления незначительной чувствительности к нему нейтрофилов крови инфицированных, но здоровых людей, эта дозировка нашла широкое применение в данном тесте. Таким образом, для постановки реакции не следует применять малоконцентрированные стандартные разведения аллергена.

В ходе исследований было установлено, что у разных лиц выраженность амебоидной реакции нейтрофилов в контрольных образцах крови была неоднозначной: в одних случаях она не регистрировалась вообще, в других достигала 3—5—10%. Для максимального исключения ошибок в оценке специфической реакции нейтрофилов на аллерген количество зафиксированных клеток с проявлениями амебоидной активности в контрольном препарате вычиталось из аналогичного числа, полученного при просмотре опытного мазка.

При воспроизведении теста ППН внимание исследователя должно быть сосредоточено еще на двух обстоятель-



**Б**  
 Рис. 3. Тест ППН. Реакция нейтрофилов крови сенсibilизированного больного на специфический аллерген.  
 А — нейтрофил в состоянии покоя; Б, В — разные формы амёбoidной активности нейтрофилов (реакция на гликоген по А. Л. Шабадашу).



*В*

**Рис. 3. Тест ППН. Реакция нейтрофилов крови сенсibilизированного больного на специфический аллерген.**

*Б, В* — разные формы амебоидной активности нейтрофилов (реакция на гликоген по А. Л. Шабадашу).

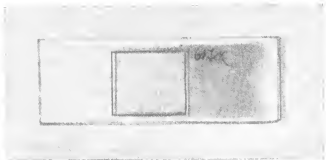


Рис. 5. Область микроскопии нейтрофилов в мазке крови при постановке теста ППН.

ствах. Выше уже говорилось о существовании определенной зависимости между температурой среды, в которой находятся нейтрофилы, и их амебоидной активностью. Из этого вытекает не только необходимость соблюдения постоянного температурного режима в период инкубации крови, но и регламентации времени, в течение которого из пробирок забирается кровь для приготовления мазков после того, как штатив с пробирками вынут из термостата. Далее, хорошо известно, что диаметр лейкоцитов в мазке крови существенно зависит от толщины мазка. В начальной, толстой, части мазка нейтрофилы выглядят мелкими по сравнению с его тонкой частью, где элементы несколько распластаны. Таким образом, оценка реакции нейтрофилов на аллерген оказывается более удобной во второй и последней третях препарата. Преимущество подсчета клеток в этих зонах состоит еще и в том, что мелкие тромбоциты, которые также насыщены гликогеном и имеют красный цвет, не способны имитировать амебоидную реакцию достаточно крупных нейтрофилов, находясь в непосредственном соприкосновении с их краями. При просмотре препарата целесообразно избегать и учета клеток, находящихся вблизи любого края мазка, где обнаруживаются механически поврежденные элементы. Оптимальная зона подсчета нейтрофилов в правильно приготовленном мазке указана на рис. 5.

При постановке теста ППН в качестве антикоагулянта используется 5% раствор цитрата натрия. Применение гепарина не рекомендуется из-за его достаточно выраженного повреждающего действия на гранулоциты крови. Учи-

тивая, что одни аллергены выпускаются в сухом (лиофилизированном) виде, а другие — в жидком, были разработаны две модификации консервации крови. В том случае, когда используется сухой препарат (например, туберкулин); во вскрытую ампулу вносят 1 мл стерильного 5% цитрата натрия. Аллерген растворяется и затем применяется для исследований (в случаях диагностики с использованием антибиотиков в качестве аллергенов для последующих разведений также берут 5% раствор). При работе с жидким аллергеном чаще всего необходимо обеспечить его высокую исходную концентрацию. Достигается это (В. А. Фрадкин, О. Г. Соломатина, 1963) использованием 25% раствора цитрата натрия: из ампулы набирают 0,8 мл аллергена и переносят в пробирку, где он смешивается с 0,2 мл 25% стерильного раствора цитрата. В результате конечная концентрация антикоагулянта оказывается, как и в первом варианте, равной 5%, а препарат теряет только 20% от своей исходной концентрации. В тех случаях, когда концентрированный раствор аллергена в смеси с цитратом натрия вызывает реакцию у нейтрофилов крови контрольной группы лиц, препарат подвергается последующему разведению (1:2, 1:4, 1:10 и т. д.) до той степени, которая обеспечит отсутствие выраженной амебоидной реакции со стороны нейтрофилов или внутриклеточных дегенеративных изменений (см. тест альтерации нейтрофилов).

Для проведения гистохимической реакции на гликоген по А. Л. Шабадашу мазки крови (тотчас после их приготовления) фиксируют в спиртовом растворе нитрата меди и нитрата кальция с добавлением к нему непосредственно перед фиксацией формалина [на каждые 100 мл 96° этилового спирта берут 1,8 г  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 0,9 г  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и 10 мл 40% формалина]. После добавления формалина фиксатор пригоден для работы в течение 2—3 ч. Спустя 40 мин после погружения мазков в фиксатор их отмывают от формалина в трех порциях 96° этилового спирта (по 10 мин в каждой порции). При повторных исследованиях порцию спирта, которая являлась первой (максимальное загрязнение формалином), отбрасывают, а вторую и третью порции применяют соответственно в качестве первой и второй. Для заключительной отмывки используют новую порцию спирта. Подсохшие на воздухе мазки пригодны для проведения реакции на гликоген в течение неопределенно долгого времени.

Детальное описание предложенной в 1947 г. А. Л. Шабдашем гистохимической реакции на гликоген содержится в руководстве Г. И. Роскина и Л. Б. Левинсон «Микроскопическая техника» (1957)<sup>1</sup>. Применительно к обработке мазков крови основные этапы реакции состоят в следующем: 1) инкубация (20—25 мин) в растворе периодата при комнатной температуре, 2) промывание (2—3 мин) в дистиллированной воде, 3) погружение на 20—25 мин в реактив Шиффа, 4) обработка в трех порциях сернистой воды (по 2 мин в каждой), 5) трехкратное промывание (по 15 мин) в дистиллированной воде. При постановке теста ППН препараты проходят еще один этап обработки — в растворе гематоксилина. Время окраски ядер лейкоцитов гематоксилином зависит от его качества (2—10 мин).

В случае необходимости может быть осуществлен контроль специфичности выявления гликогена. Для этого мазки обрабатывают амилазой в течение 40 мин в термостате (на каждые 10 мл физиологического раствора добавляют 0,25 мл профильтрованной через бумажный фильтр амилазы слюны).

При изучении реакции нейтрофилов для каждого обследуемого лица готовят ряд пробирок. При использовании одного аллергена достаточно двух пробирок: опытной и контрольной. Если аллергенов несколько, то на каждый аллерген берут отдельную пробирку и одну общую для контроля. В опытные пробирки стерильными микропипетками вносят 0,02 мл аллергена, разведенного раствором цитрата натрия, в контрольные — 0,02 мл 5% цитрата натрия. В связи с тем что при многодневном хранении растворенного в цитрате натрия аллергена его активность может меняться, наиболее стабильные результаты получаются при использовании одной и той же серии свежеразведенного препарата. Используемый в контроле 5% раствор цитрата натрия не должен вызывать при 2-часовой инкубации заметного усиления амебоидной активности нейтрофилов крови. Практика позволяет считать, что качественным является такой раствор, при использовании которого в контрольных препаратах большинства обследуемых лиц определяется не более 10% нейтрофилов с проявлениями амебоидной активности. Как и при других цитологических

<sup>1</sup> Приготовление реактивов для реакции на гликоген изложено и в наставлении, прилагаемом к каждой коробке концентрированного аллергена для теста ППН.

исследованиях, на стабильность контролей ППН существенное влияние оказывают качество дистиллированной воды и обработка лабораторной посуды. Сдвиг среды в щелочную сторону вызывает неспецифическое повреждение нейтрофилов крови.

Для каждой опытной или контрольной пробы микропипеткой набирают по 0,08 мл крови и вносят в околodonную часть пробирки (первая капля отбрасывается). Для получения антикоагулирующего эффекта пробирки слегка встряхивают, закрывают пробками и ставят на 2 ч в термостат при 38°. Пробирку, взятую после инкубации для приготовления мазков, снова слегка встряхивают в целях равномерного распределения лейкоцитов во всем объеме крови. Из каждой пробы рекомендуется (в целях надежности) делать по два мазка средней толщины. Для приготовления мазков используют химически чистые, обезжиренные предметные стекла. Подсушенные на воздухе мазки маркируют, собирают в пачки или ставят в специальный контейнер для фиксации.

Оценка теста ППН предусматривает просмотр 100 нейтрофилов в контрольном и 100 — в опытном мазках. При микроскопии нейтрофилы делят на две категории: нормальные и поврежденные — с достаточно объективными проявлениями амебоидной реакции.

Результаты подсчета обрабатывают по формуле:

$$\frac{H_1 - H_2}{100},$$

где  $H_1$  — число поврежденных нейтрофилов в опыте;  $H_2$  — число поврежденных нейтрофилов в контроле; 100 — количество просмотренных в мазке клеток.

Попытки дополнить вышеописанный критерий амебоидной активности клеток оценкой концентрации в них гликогена успеха не имели. Не говоря о существенных индивидуальных колебаниях этого признака и недоказанности его непосредственной связи со степенью повреждения нейтрофилов аллергеном, необходимо указать, что интенсивность визуально воспринимаемой реакции на гликоген зависит от степени распластанности клетки на стекле, что в свою очередь определяется толщиной мазка. Несомненное значение имеет и активность использованных реактивов. Не дало никаких преимуществ и рассмотрение выраженности ППН с учетом средней величины псевдоподий или их среднего числа на один нейтрофил.



## Механизм теста ППН

Говоря об участии полиморфноядерных лейкоцитов в формировании иммунитета, следует указать, что со времени классических работ И. И. Мечникова основное внимание исследователей постоянно сосредоточивалось на фагоцитозе. Успехи гистохимии и открытие лизосом стимулировали расшифровку наиболее интимных сторон этой функции клеток. Несравненно меньше информации было накоплено о влиянии гуморальных факторов на функциональную активность нейтрофилов крови.

Первые результаты применения теста ППН были доложены нами в 1961 г. на конференции «Вопросы аллергии в современной клинике» и были связаны с оценкой сенсибилизации больных туберкулезом к туберкулину. К настоящему времени тест ППН апробирован с аллергенами стрептококка, стафилококка, с листерином, бруцеллином, токсоплазмином, дизентерином, с рядом тканевых аллергенов и антибиотиками. Этот факт позволяет утверждать, что феномен усиления амебоидной активности нейтрофилов крови сенсибилизированного лица при контакте со специфическим аллергеном имеет в патологии достаточно широкое распространение. В изучение механизмов этого феномена существенный вклад внесли исследования, выполненные М. И. Китаевым и И. Б. Засухиной (1971). Изучая проявления аутоаллергии к антигену легкого у больных туберкулезом, авторы поставили перед собой задачу оценить роль циркулирующих и фиксированных на клетках аутоантител и комплемента в тесте ППН.

Используя различные комбинации ингредиентов при постановке пробы (тканевой антиген, сыворотка и лейкоциты больных или здоровых людей), авторы доказали, что интенсивность амебоидной активности нейтрофилов при инкубации крови с тканевым антигеном существенно зависит от свободно циркулирующих в крови аутоантител (табл. 2).

Более того, реакция нейтрофилов могла быть воспроизведена при инкубации крови здорового человека с сывороткой больных туберкулезом. Лейкоциты здоровых доноров фиксировали из сыворотки сенсибилизированных больных противотканевые и противотуберкулезные антитела. Однако поступление в плазму антител с экстрактом разрушенных лейкоцитов хотя и приводило к существенному повышению их титра, но не вызывало заметного повреждения

Таблица 2

*Роль гуморальных факторов в механизме аутоаллергической повреждаемости нейтрофилов с легочным антигеном при туберкулезе легких (по М. И. Китаеву и И. Б. Засузиной, 1971)*

Серия исследований	Число исследований	ППН с легочным антигеном
		$M \pm m$
Нейтрофилы больных туберкулезом в собственной сыворотке	34	$0,12 \pm 0,01$
Нейтрофилы здоровых доноров в собственной сыворотке	12	$0,04 \pm 0,008$
Нейтрофилы больных туберкулезом в сыворотке здоровых доноров	34	$0,06 \pm 0,01$
Нейтрофилы здоровых доноров в сыворотке больных туберкулезом	38	$0,16 \pm 0,01$
Нейтрофилы здоровых доноров в истощенной сыворотке больных туберкулезом	14	$0,05 \pm 0,008$
Нейтрофилы здоровых доноров с экстрактом разрушенной клеточной взвеси крови больных	15	$0,03 \pm 0,005$
Нейтрофилы здоровых доноров, нагруженные легочным антигеном, в сыворотке больных туберкулезом	10	$0,21 \pm 0,03$
Нейтрофилы здоровых доноров в инактивированной сыворотке больных туберкулезом	24	$0,05 \pm 0,01$
Нейтрофилы здоровых доноров в реактивированной сыворотке больных туберкулезом (добавлен комплемент)	14	$0,16 \pm 0,02$

нейтрофилов донора в присутствии специфических аллергенов. Определенная зависимость обнаружилась в отношении участия в реакции полного комплементарного комплекса или отдельных его фракций ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ): инактивация комплемента снижала повреждаемость нейтрофилов, а его добавление в бескомплементарную сыворотку восстанавливало реакцию. Подобные же данные ранее получили Н. В. Медуницын и В. Б. Гервазиева (1967), изучавшие реакцию полиморфноядерных лейкоцитов у больных полинозами на пыльцевые аллергены. Ими также отмечена зависимость повреждения клеток от циркулирующих кожно-сенсibilизирующих антител, концентрировавшихся во фракции IgA белков сыворотки. Работая под нашим руководством, Ю. П. Жуклис подтвердил значение гуморальных факторов в воспроизведении реакции нейтрофилов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние сыворотки больных туберкулезом легких на повреждаемость нейтрофилов туберкулином (по Ю. П. Жуклису, 1970)

Значения ППН в груп- пах больных детей	Число исследо- ваний	Тубер- кулин ( $M \pm m$ )	Показатель повреждения нейтрофилов			
			сыворотка донора „а“ (ППН у донора 0,45)		сыворотка донора „б“ (ППН у донора 0,05)	
			с тубер- кулином	без тубер- кулина	с тубер- кулином	без тубер- кулина
Низкие	23	0,06 ( $\pm 0,01$ )	0,43 ( $\pm 0,03$ )	0,02 ( $\pm 0,005$ )	0,06 ( $\pm 0,01$ )	0,02 ( $\pm 0,005$ )
Высокие	23	0,20 ( $\pm 0,01$ )	0,48 ( $\pm 0,03$ )	0,03 ( $\pm 0,01$ )	0,16 ( $\pm 0,01$ )	0,02 ( $\pm 0,01$ )

Заготовив сыворотку от больных туберкулезом с высокими и низкими значениями ППН на туберкулин, Ю. П. Жуклис обследовал 46 детей школьного возраста, страдавших различными формами первичного туберкулеза. Оказалось, что инкубация крови в смеси с туберкулином и сывороткой больного с высоким уровнем ППН вызывала резкое усиление активности гранулоцитов. Усиление отмечалось не только в опытах с кровью детей с низким исходным значением ППН, но и в опытах, где показатели исходной реакции были достаточно высокими. Уместно указать, что в каждой из двух перечисленных групп показатели увеличивались не выше уровня, который был зафиксирован в реакции с кровью самого донора на туберкулин.

На первых этапах изучения теста ППН у нас складывалось впечатление, что видимые под микроскопом изменения нейтрофилов указывают на необратимые изменения в клетках и отражают их распад. Однако специальные наблюдения, проведенные в жидкой камере при инкубации крови больных туберкулезом с туберкулином, опровергли эту точку зрения (В. А. Фрадкин, 1967). В камере с жидкостью реакция нейтрофилов на аллерген регистрировалась при помощи фазово-контрастной микроскопии и цейтраферной киносъемки (16 кадров в минуту).

Наблюдения показали (рис. 6), что видимые в фиксированном мазке изменения контуров полиморфноядерных лейкоцитов не являются результатом необратимого лизиса, а отражают интенсивную амебоидную реакцию. В течение первых 2 ч инкубации амебоидная активность харак-

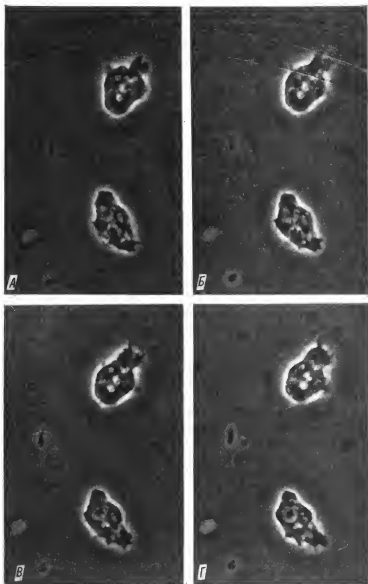
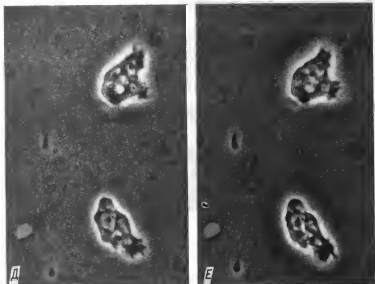


Рис. 6. Амебоидная активность нейтрофилов крови больного туберкулезом после добавления туберкулина в жидкую камеру (фазово-контрастная микроскопия, интервал между кадрами 3, 7 с).



теризовалась пульсирующим ритмом: периодически она затихала и клетки возвращались к сферической форме. Для уточнения условий взаимодействия нейтрофилов с растворенным аллергеном сотрудники нашей лаборатории А. В. Давыдова и С. Ф. Радунская использовали туберкулин, меченный изотиоционатом флюоресцеина. Предварительные кожные пробы, поставленные зараженным туберкулезом животным, подтвердили его активность. Применение меченого туберкулина показало, что нейтрофилы крови больных туберкулезом уже в течение первых 15 мин инкубации поглощали заметные количества препарата, а спустя 30 мин он нередко заполнял всю цитоплазму. В противоположность этому нейтрофилы инфицированных, но практически здоровых людей поглощали туберкулин незначительно.

Заметное на снимках (рис. 7) «обтекание» меченым аллергеном ядерных зон указывает на проникновение препарата в цитоплазму. Разумеется, приведенные данные являются еще недостаточными для полной расшифровки механизма реакции нейтрофилов крови на антиген. И тем не менее в своей совокупности они несомненно говорят о иммунологической природе этого явления.

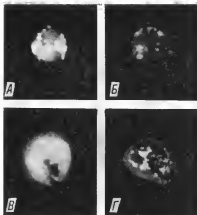


Рис. 7. Пиноцитоз меченого туберкулина нейтрофилами крови спустя 15 мин с момента начала инкубации у больного туберкулезом (А) и здорового человека (Б) и спустя 30 мин (соответственно В и Г).

## Тест ППН при туберкулезе

Для реакции применяется очищенный лиофилизированный туберкулин. При постановке реакции *in vitro* содержимое ампулы туберкулина растворяют в 1 мл стерильного 5% раствора цитрата натрия.

*Диагностика туберкулеза легких у взрослых.* В клинике туберкулеза оценка чувствительности больных к туберкулину относится к первоочередным исследованиям, результаты которых должны характеризовать специфическую реактивность организма в различные периоды заболевания. Применение для этих целей ППН показало не только диагностическую значимость повышения данного показателя, но и возможность разграничения клинических фаз туберкулезного процесса: обострения и затихающего обострения. В качестве примера рассмотрим результаты оценки ППН у 241 взрослого с активным туберкулезным процессом в легких. В период туберкулинодиагностики в соответствии с данными комплексного клинического обследования больных у 123 человек процесс характеризовался фазой обострения (средний показатель — 0,37), у 118 — фазой затихающего обострения (средний показатель — 0,23). Используемая для статистической обработки материала эмпирическая функция распределения строилась по точкам абсциссы, на которую наносили значения ППН; точки оси ординат соответствовали (в процентном выражении) количеству случаев, в которых выраженность признака не

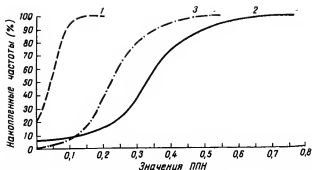


Рис. 8. Функции эмпирического распределения показателей теста ППН на туберкулин у практически здоровых лиц и больных туберкулезом легких.

1 — здоровые; 2 — больные в фазе обострения; 3 — больные в фазе затихающего обострения.

превосходила данного значения. Иначе говоря, при этом получалось изображение распределения в виде кривой, ординаты которой пропорциональны накопленным частотам вариационного ряда. Для оценки существенности различий двух средних величин был применен критерий  $\lambda$ , предложенный А. Н. Колмогоровым и Н. В. Смирновым (цит. по Н. А. Плохинскому, 1961). Обсуждение вопроса статистической обработки данных, отражающих реакцию лейкоцитов крови на аллерген, вызвано тем обстоятельством, что во многих случаях вариабельность обсуждаемых реакций в недостаточной степени описывается законом нормального распределения. Как отмечают И. П. Ашмарин и А. А. Воробьев (1962), в иммунологических исследованиях отклонения такого рода встречаются достаточно часто. По-видимому, выраженность иммунологических и аллергических реакций нередко определяется факторами, действие которых пока еще не поддается учету. В результате обработки данных установлено (рис. 8), что значение критерия между каждой из трех функций распределения значительно превосходит величину 1,95, и, следовательно, различия между совокупностями высокодостоверны. Для большей наглядности рассмотрим эти же материалы на производных от функций распределения. Последние получались путем графического дифференцирования сглаженного графика эмпирической функции распределения (способ простой скользящей средней). Как показывает график

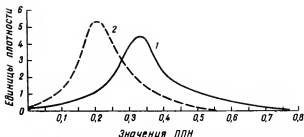


Рис. 9. График плотности распределения показателей ППН под влиянием туберкулина у больных туберкулезом легких при обострении и затихании процесса.

1 — фаза обострения; 2 — фаза затихающего обострения.

плотностей (рис. 9), в группе больных с затихающим обострением максимальная частота падала на значение ППН 0,2, а в группе с обострением — 0,33. Точка пересечения совокупностей соответствовала значению 0,28. При обострении процесса выше этого показателя находилось 67,5% вариантов, при затихающем обострении — только 25,2. В группе практически здоровых людей (см. рис. 8) 93,2% вариант оставались в пределах 0,1 и только в 6,8% значения ППН были выше (0,11—0,2).

По формам заболевания больные туберкулезом легких распределялись следующим образом: фиброзно-кавернозный процесс — 63 человека, инфильтративно-пневмонический — 69, гематогенно-диссеминированный — 33, очаговый туберкулез — 57, прочие формы туберкулеза легких — 9, состояние после хирургического лечения туберкулеза легких — 10. Статистическая обработка данных по этим группам вне зависимости от клинических фаз заболевания позволяет сделать вывод, что форма туберкулезного процесса в легких незначительно влияет на выраженность реакции нейтрофилов на туберкулин. Среднее значение ППН при фиброзно-кавернозном процессе было равно 0,34, при инфильтративно-пневмоническом — 0,31, при гематогенно-диссеминированном — 0,3, при очаговом процессе — 0,26. Без учета клинических фаз процесса практически равнозначной оказалась выраженность теста и в трех возрастных подгруппах между 17 и 72 годами.

Принципиально совпадающие результаты были получены В. Я. Гергертом (1970). Если при обострении туберкулеза легких (фаза инфильтративной вспышки) средний уровень ППН был равен 0,31, то в период начального затихания процесса средний показатель соответствовал уже



0,27. В отдаленные сроки от начала ремиссии ППН был еще ниже: в группе больных, у которых до начала эффективной химиотерапии наблюдалось обострение процесса, — 0,21, в группе с неактивным туберкулезом — 0,13.

Рассмотрим результаты сопоставления реакции нейтрофилов крови с показателями внутрикожной туберкулинодиагностики. Для обоих тестов использовалась одна серия туберкулина. Больным одновременно ставились четыре пробы Манту с разведениями аллергена  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  и 1 : 2000. При этом в отличие от диагностической значимости теста ППН при различных фазах туберкулезного процесса титрование по Манту такого эффекта не дало (табл. 4). Заметим, что у 10 больных даже при внутрикожной пробе с туберкулином в разведении 1 : 2000 реакция отсутствовала. И в этих 10 случаях реакция нейтрофилов была высокой (8 человек) или повышенной (2 человека).

Таблица 4

*Сопоставление результатов определения ППН и кожной пробы Манту*

Фазы туберкулезного процесса	Число больных	Порог чувствительности кожи к туберкулину			
		$10^{-4}$ — 1 : 2000 и ниже		$10^{-5}$ — $10^{-6}$	
		число больных	средняя величина ППН	число больных	средняя величина ППН
Обострение Затихающее обострение	94	83	0,37	11	0,36
	77	66	0,24	11	0,30
Всего . . .	171	149		22	

Обсуждая вопросы интенсивности реакции нейтрофилов на туберкулин, следует иметь в виду, что абсолютная величина показателя безусловно зависит от активности использованного аллергена, на что мы обращали внимание при переходе от одной серии препарата к другой (В. А. Фрадкин, Е. Г. Меерович, 1965). И это вполне понятно, так как утвержденные техническим регламентом колебания в активности разных серий туберкулина могут достигать 20%. Заметим, что в отношении других бактериальных аллергенов такого рода различия могут быть еще более значительными. Однако вне зависимости от этих колебаний

выраженность ППН у больных туберкулезом постоянно остается достоверно более высокой, чем у инфицированных, но практически здоровых людей, и постоянно сохраняются существенные различия в интенсивности реакции при клинически отличных фазах процесса: обострения и затихания. Используя тест ППН, к аналогичным заключениям пришли Г. С. Фенстер (1968), В. В. Марчек (1968), Б. Д. Агапонов (1969), Л. П. Чумакова (1973).

Диагностические возможности теста ППН были проверены и в условиях динамического изучения аллергии. У 107 больных туберкулезом легких аллергия изучалась 2 или 3 раза. Сдвиги ППН рассматривались под углом зрения изменений, возникавших у больных в клинической картине заболевания между начальным и каждым из последующих исследований. У большинства больных переход процесса в фазу затихания сопровождался снижением чувствительности нейтрофилов к туберкулину.

В исследовании В. М. Тавровского, Л. П. Чумаковой и А. Р. Шик (1973) реакция нейтрофилов крови была применена для характеристики изменений специфической аллергии у больных туберкулезом легких в ближайшие сроки после резекции легкого. Постановка теста ППН производилась до операции и еженедельно в продолжение полутора месяцев после операции. Оказалось, что оперативное удаление основного туберкулезного очага сравнительно быстро приводило к значительному снижению степени аллергической реакции на туберкулин. Авторы приходят к заключению о целесообразности применения ППН для уточнения активности остаточных туберкулезных изменений и определения тактики в отдаленном послеоперационном периоде.

*Диагностика туберкулеза глаз.* Распознавание заболеваний туберкулезной этиологии в офтальмологической практике представляет определенные трудности. Они вытекают из отсутствия патогномонических признаков, скудности субъективной и объективной симптоматики. Кроме того, применение специфических провокационных проб (подкожное введение туберкулина) во многих случаях встречает противопоказания и признается клиницистами небезопасным.

Использование теста ППН для диагностики туберкулеза глаз было осуществлено М. И. Китаевым, Н. Г. Виноградовой (1971) и Т. Д. Малютиной (1971). Т. Д. Малютина применила реакцию нейтрофилов на туберкулин у больных

с такими хроническими заболеваниями, как серозные вяло текущие увеиты, дисфункции цилиарного тела и др. Контрольная группа включала в себя больных острыми пластическими иридоциклитами. В активном периоде туберкулезного заболевания глаз повышенные и высокие значения ППН регистрировались у 79,5% больных. В тех случаях, когда специфическая противотуберкулезная терапия сопровождалась отчетливым клиническим эффектом, интенсивность амебoidalной реакции нейтрофилов на туберкулин снижалась. У большинства больных контрольной группы (78,2%) показатель повреждения нейтрофилов был низким.

М. И. Китаев и Н. Г. Виноградова использовали тест ППН для оценки проявлений аллергии у больных с метастатическим туберкулезом глаз и заболеваниями глаз нетуберкулезной этиологии (кератиты, склериты, увеиты, хорионидиты и др.). В то время как при активных формах метастатического туберкулеза глаз средний показатель реакции составил 0,22 ( $\pm 0,01$ ) в контрольной группе он равнялся 0,02 ( $\pm 0,002$ ). В случаях успешной комплексной терапии чувствительность нейтрофилов к туберкулину угасала. На основании сопоставления у одних и тех же больных проб Пирке и теста ППН авторы пришли к выводу, что последний лучше отражает сенсibilизацию организма.

*Диагностика туберкулеза кожи.* Изучение аллергии к туберкулину методом ППН при специфических туберкулезных и неспецифических поражениях кожи было проведено П. Б. Вейнеровым, Л. С. Когосовой и Ю. А. Рудченко (1971). Под наблюдением находились больные с выраженными туберкулезными изменениями кожных покровов, лица, получавшие профилактическое противорецидивное лечение, и больные с поражениями кожи нетуберкулезной этиологии. Реакция нейтрофилов у лиц с активным туберкулезным процессом была достоверно выше, чем у людей, получавших превентивную специфическую терапию. У больных с нетуберкулезными изменениями кожи выраженность ППН была близка к нулю (0,02).

*Диагностика туберкулеза мочеполовой системы.* Диагностика туберкулеза в урологической клинике относится к сложным разделам инфекционной патологии. Результаты применения теста ППН у 158 больных туберкулезом почек и мочеполовой системы освещает работа М. И. Китаева, Е. П. Еганова и С. Кулбаевой (1971). В активных фазах

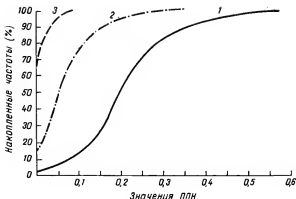


Рис. 10. Функции эмпирического распределения показателей теста ППН на туберкулин у больных туберкулезом и здоровых детей. 1 — фаза обострения; 2 — фаза затихающего обострения; 3 — контроль (здоровые).

нелеченого туберкулеза почек и мочеполового тракта среднегрупповые значения реакции соответствовали 0,25 ( $\pm 0,016$ ) и 0,20 ( $\pm 0,02$ ). Из 68 больных этих двух групп только у 3 человек тест ППН не был повышен. Затихание специфического процесса в результате комплексной терапии сопровождалось четкой нормализацией показателя. Последний снижался до уровня контрольной группы (0,03) с нетуберкулезными поражениями органов.

**Диагностика костно-суставного туберкулеза.** По данным литературы, специфическая сенсibilизация у больных костно-суставным туберкулезом ниже, чем у больных с другими локализациями процесса. Эта закономерность проявилась и при применении теста ППН (Д. К. Кожомкулов, 1971). В активной фазе туберкулезного спондилита, коксита или гонита средние величины ППН находились в пределах 0,15—0,17. В неактивные периоды болезни показатели достоверно снижались до 0,05—0,09 и приближались к показателям больных с острыми и хроническими остеомиелитами, опухолями костей, врожденными вывихами. Д. К. Кожомкулов отмечает, что реакция нейтрофилов на туберкулин имеет диагностическое значение в клинике костно-суставного туберкулеза.

**Диагностика туберкулеза у детей.** Выявление туберкулеза у детей продолжает оставаться одной из сложных дифференциально-диагностических проблем в педиатрии,

поскольку начальные формы заболевания чаще всего представляют собой своеобразный клинический синдром, которому сопутствует реакция лимфатических узлов, не выявляемая методами рентгенодиагностики. Симптомы туберкулезной интоксикации не специфичны у детей и часто зависят от других, не связанных с туберкулезом причин (ревматизм, тонзиллит и т. п.). Введенный в практику метод внутрикожной противотуберкулезной вакцинации существенно затруднил выявление с помощью кожных туберкулиновых проб состояния первичной туберкулезной инфекции у детей — состояния «виража».

По наблюдениям А. А. Ефимовой (1965), у детей младшего возраста через 1½ мес после введения вакцины БЦЖ на внутрикожные туберкулиновые пробы реагировало 92,3%, а спустя год — 94% детей. На таком уровне наружные кожные покровы отвечали специфическими реакциями на туберкулин в течение 5 лет. Подобные же результаты наблюдались и при обследовании детей старшего возраста (Л. А. Митинская, 1966). Вот почему дифференцировка

Таблица 5

*Выраженность ППН у больных туберкулезом детей при различных формах и клинических фазах процесса*

Характер туберкулезного процесса		Средне-групповое значение ППН	Выраженность ППН (число случаев)				
форма заболевания	активность		всего наблюдаемый	0,00—0,10	0,11—0,20	0,21—0,30	0,31—0,57
Первичный локальный туберкулез	Вспышка	0,20	32	6	14	7	5
Вторичный туберкулез		0,23	17	4	4	5	4
Туберкулезная интоксикация		0,23	32	1	13	13	5
Первичный локальный туберкулез	Затихание	0,07	75	58	12	3	2
Вторичный туберкулез		0,09	26	19	5	2	—
Туберкулезная интоксикация		0,06	22	17	4	1	—
Контрольная группа (больные ревматизмом)		0,05	34	32	2	—	—

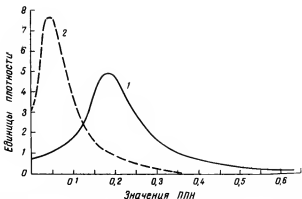


Рис. 11. График плотности распределения показателей ППН под влиянием туберкулина у больных туберкулезом детей при обострении и затихании процесса.

1 — фаза вспышки; 2 — фаза затихания.

инфекционной и поствакцинальной сенсibilизации организма с помощью реакций кожи на аллерген превратилась в трудно разрешимую проблему. При этих условиях необходимость применения новых методов диагностики аллергии к туберкулину вполне очевидна.

Использование теста ППН в клинике детского туберкулеза было осуществлено нами совместно с Н. Н. Ильяш (1965). У большинства больных диагностировался первичный локальный туберкулез. В 29% случаев туберкулезный процесс не имел ясной локализации (ранняя и хроническая интоксикация), в 20% определялся вторичный туберкулез. Наиболее часто выраженные реакции (выше 0,2) встречались среди детей с симптомами туберкулезной интоксикации. Наименее выраженной чувствительностью нейтрофилов к туберкулину характеризовались большие с первичными локальными формами процесса. Как и в клинике туберкулеза у взрослых, различия между фазами обострения и затихающего обострения процесса у детей оказались существенными (рис. 10). Если в период обострения вне зависимости от формы заболевания абсолютное большинство значений ППН оказалось выше 0,1 и более чем у половины детей превосходило 0,2, то при затихающем обострении около 80% всех проб характеризовалось показателями в пределах 0,1 (табл. 5). Весьма наглядно это иллюстрирует график плотности распределения признака (рис. 11).

Несколько подробнее остановимся на группе детей младшего возраста, которая состояла из 16 мальчиков и 17 девочек в возрасте от 9 мес до 3 лет, поступивших в больницу с подозрением на туберкулез (всего 33 ребенка). В результате клинического обследования у 5 детей диагноз туберкулеза был отвергнут. У 28 детей заболевание туберкулезом было подтверждено. Из 28 больных туберкулезом детей 7 были с локальными проявлениями процесса (1 ребенок с первичным туберкулезным комплексом и 6 — с бронхоаденитом), а 21 — с туберкулезной интоксикацией (с ранней — 20, с хронической — 1). У 3 детей, кроме того, имелся кератоконъюнктивит. В тех случаях, когда диагноз туберкулеза был отвергнут, дети выписались из больницы с диагнозами: неспецифическая пневмония, «вираж» туберкулиновых проб без явлений интоксикации, поствакцинальная аллергия.

Реакция нейтрофилов крови на туберкулин исследовалась у большинства детей в первые дни поступления в больницу до лечения туберкулостатическими препаратами. В период обследования у всех детей с туберкулезом были ярко выражены симптомы интоксикации: бледность покровов, вялость, плохой аппетит, пониженное питание и плохой тургор тканей. У всех пальпировались VI—VII и даже VIII группы лимфатических узлов 2—3-го размера, эластичные, мягкие, реже плотно-эластичные. Рентгенологически у детей с ранней интоксикацией выявлялось усиление сосудистого рисунка. У 6 детей с бронхоаденитом был обнаружен правосторонний туберкулез бронхо-пульмональных узлов в фазе инфильтрации и у одного — в фазе рассасывания. У 22 детей скорость оседания эритроцитов была увеличена, у 13 в формуле крови отмечалась нейтрофилия, преимущественно без «сдвига влево». У всех детей сопутствующим заболеванием был рахит I—II степени в фазе разгара или реконвалесценции. У большинства больных туберкулезом детей раннего возраста (19 из 28) показатель повреждения нейтрофилов был повышен (табл. 6).

Если теперь рассмотреть интенсивность ППН в зависимости от возраста детей, то окажется, что при обострении туберкулезного процесса реакция лейкоцитов в первой возрастной группе была несколько менее выражена (табл. 7).

Не исключено, что эта закономерность определялась не только особенностями реактивности детей раннего возраста.

Таблица 6

Выраженность ППН у больных туберкулезом детей раннего возраста

Группа детей	Число детей	Выраженность ППН (число случаев)			
		0,00—0,05	0,06—0,1	0,11—0,2	0,21—0,43
<i>Больные туберкулезом:</i>					
Туберкулезная интоксикация	21	6	—	9	6
Локальные формы туберкулеза	7	1	2	1	3
Всего . . .	28	7	2	10	9
Туберкулезный процесс отсутствует	5	4	—	1	—

Таблица 7

Выраженность ППН у больных туберкулезом детей (фаза обострения процесса в различных возрастных группах)

Возраст детей	Выраженность ППН (%)				
	0,00—0,1	0,11—0,20	0,21—0,30	0,31—0,40	0,41—0,57
9 мес—3 года	32	36	21	7	4
4—7 лет	17	33	33	7	10
8—12 лет	12	64	17	17	—
13—16 лет	10	40	30	10	10

ста, но и первичным и сравнительно недавним введением им вакцины БЦЖ (в части случаев за 9—18 мес до проведения исследований).

Как и у взрослых, постановка туберкулиновых реакций *in vivo* (пробы Пирке) не позволила расчленить у детей клиническую фазу процесса (обострение и затихание). В этой связи какой-либо корреляции между выраженностью кожных проб и тестом ППН установить не удалось.

### Дифференцировка инфекционной и вакцинальной аллергии к туберкулину

Внедрение в практику внутрикожного метода противотуберкулезной вакцинации и ревакцинации существенно усложнило дифференцировку поствакцинальной и постин-



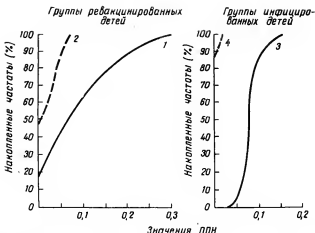


Рис. 12. Функции эмпирического распределения теста ППН на туберкулин у здоровых, но инфицированных или ревакцинированных вакциной БЦЖ детей.

1—2 — 6 мес; 2 — более 6 мес после ревакцинации; 3 — первые 6 мес; 4 — более 12 мес после появления «виража».

фекционной аллергии. Исследования последних лет указывают на то, что после внутрикожного введения БЦЖ выраженность аллергии к туберкулину достигает своего максимума спустя 12 мес и этот уровень не снижается в течение 5 лет. Регистрация в этих условиях положительных проб Пирке или Манту обычно может служить основанием для установления времени туберкулинового «виража».

Применение нами совместно с Л. А. Митинской и Н. Н. Ильяш теста ППН в разные сроки после ревакцинации детей показало (рис. 12), что уже через 6 мес после введения вакцины БЦЖ повышения чувствительности нейтрофилов к туберкулину не обнаруживается. Это обстоятельство и создает оптимальные условия для дифференцировки инфекционной аллергии у ревакцинированных детей. В самом деле, если при обследовании ребенка реакция нейтрофилов на туберкулин оказывается повышенной или высокой и если известно, что в предшествующие 6 мес вакцина БЦЖ ему не вводилась, то с достаточным основанием можно ставить вопрос о том, что повышение ППН является следствием свежего инфицирования (см. рис. 12) или активного туберкулезного процесса.

Представляет интерес попытка В. М. Борис (1969) разграничить поствакцинную и постинфекционную аллергию у тех детей, у которых первичная постановка теста ППН не выявила его повышения. По данным автора, в тех случаях, когда происходило инфицирование, внутрикожная проба Манту с 5 туберкулиновыми единицами вызывала спустя 24 ч достоверное повышение реакции нейтрофилов на аллерген. В случае аллергической перестройки, обусловленной противотуберкулезной внутрикожной вакцинацией, такого повышения не наблюдалось. Следует думать, что эти различия были обусловлены более глубокой аллергической перестройкой детского организма в результате внедрения вирулентных штаммов микобактерий туберкулеза.

## Тест ППН при других инфекциях

*Оценка аллергии к гемолитическому стрептококку.* Успешное применение теста ППН в клинике туберкулеза послужило отправной точкой для исследований, направленных на использование реакций нейтрофилов крови с другими бактериальными аллергенами. В связи с тем, что большинство из них в процессе изготовления не подвергается лиофильному высушиванию, нами была предложена описанная выше модификация теста, дающая возможность применять для диагностики любые жидкие аллергены (В. А. Фрадкин, О. Г. Соломатина, 1963). К настоящему времени исследования, проведенные со стрептококковым аллергеном, выполнены в основном в клинике ЛОРзаболеваний и клинике ревматизма. Так, Э. В. Гюллинг (1964) оценил феномен повреждения нейтрофилов по отношению к продуктам жизнедеятельности стрептококка у 43 больных хроническим тонзиллитом, используя в качестве аллергена фильтрат бульонных культур стрептококка. Автор сообщает о существенно более высоких реакциях лейкоцитов у больных по сравнению с контрольной группой. Н. И. Винникова (1965), проведя клинико-микробиологические сопоставления при пародонтозе, указала, что среди обследованных больных повышенные значения интенсивности реакции нейтрофилов на стрептококковый аллерген встречались достаточно часто.

Применение ППН со стрептококковым аллергеном для выявления аллергии при хроническом гнойном отите мы находим и в работе В. И. Кищенко (1967). В то время

как ни у одного лица из контрольной группы реакция нейтрофилов не превысила 0,09 (средняя групповая величина 0,06), у 22 больных из 30 показатели были выше 0,1. Показатели до 0,15 были у 6, от 0,16 до 0,2 — у 12 и выше 0,21 — у 4 больных. В работе подчеркивается, что при слабоположительных реакциях кожи на аллерген значения ППН не превышали 0,15, в то время как при резко положительных реакциях тест *in vitro* колебался между 0,16 и 0,23. На достоверные различия в реакции нейтрофилов на стрептококковый аллерген у детей с аденоидными разрастаниями и рецидивирующими аденоидами и у здоровых детей указал В. Н. Медведев (1967).

Наиболее обширные наблюдения в педиатрической клинике были выполнены Л. А. Безруковым (1968). Аллергия к стрептококку изучалась у больных бронхиальной астмой, хроническим токсико-аллергическим тонзиллитом и ревматизмом. Рекомендую данный метод для практического использования в целях специфической диагностики микробной гиперчувствительности, автор подчеркивает, что лишь выраженные реакции кожи на аллерген коррелируют с тестом ППН. Так, в группе больных бронхиальной астмой (116 человек) при реакциях кожи, развивавшихся по немедленному типу и слабо выраженных (+), значения ППН от 0,11 и выше встречались в 12% случаев, а при сильной выраженности реакций (++++) совпадения с тестом нейтрофилов составили 91%. При учете реакций кожи на аллерген по замедленному типу аналогичные сопоставления обнаружили совпадения в 18% при местных реакциях (+) и 90,6% при максимальной выраженности кожных проб (++++)). В контрольной группе практически здоровых детей повышенные значения ППН (более 0,11) наблюдались лишь в 2,2% случаев.

Специальное исследование наших сотрудников было выполнено в клинике ревматизма. Для постановки проб использовали концентрированный (маточный) раствор аллергена, приготовленный в производственных условиях по методике Андо—Вержиковского. Значения ППН в пределах 0,1 были отмечены лишь у 11,6% больных. У 30% показатели были в пределах 0,11—0,15 и у 58,4% — от 0,16 и выше. Следует указать, что при анализе материала в зависимости от клинического течения заболевания наиболее высокая реакция нейтрофилов обнаружилась при активности ревматизма 2-й и 3-й степени (70% реакций от 0,16 и выше). В противоположность этому у больных с клини-

чески неактивной фазой процесса большинство показателей не превышало 0,15. При динамических наблюдениях отмечалось снижение ППН у тех больных, у которых лечение давало удовлетворительные результаты.

*Оценка аллергии к гемолитическому стафилококку.* Аллерген стафилококка выпускается в жидкой форме, в связи с чем исходная концентрация антикоагулянта (цитрат натрия) для его разведения равна 25%. Попытка применения реакции нейтрофилов в целях регистрации аллергии к гемолитическому стафилококку была предпринята нами в 1963 г. Развернутые наблюдения в этом направлении содержит работа Е. Г. Зеленовой (1971). Основной контингент обследованных ею лиц состоял из больных хроническим гнойным отитом (109 человек), среди которых у 58,8% был выделен патогенный стафилококк в чистой культуре или в ассоциации с другими микроорганизмами. В качестве условных контрольных контингентов были использованы больные, у которых флора патологического очага состояла из протей и кишечной палочки. Отдельные случаи повышенной чувствительности нейтрофилов к стафилококковому аллергену у этих лиц автор связывает с полиаллергией или изменением микрофлоры

Таблица 8

*Реакция повреждения нейтрофилов у больных стафилококковыми заболеваниями и в контрольных группах (по Е. Г. Зеленовой, 1971)*

Клинический диагноз	Флора пато- логического очага	Число обсле- дованных	ППН со ста- филококковым аллергеном					M ± m	p
			0,00— 0,12	0,13— 0,2	0,21— 0,3	0,31— и выше			
Хронический гнойный отит	Стафило- кокк	77	28	7	16	26	0,21 ± 0,02	0,001	
	Протей, кишечная палочка	32	23	4	4	1	0,10 ± 0,02		
Ложные сус- тавы костей голенн, ос- ложненные инфекцией	Стафило- кокк	26	9	8	5	4	0,17 ± 0,02	0,001	
Ложные сус- тавы костей голенн	—	16	15	1	—	—	0,05 ± 0,01		
Контроль (здо- ровые)	—	20	20	—	—	—	0,05 ± 0,01	0,001	

в зоне воспаления. Сравнительный анализ всех наблюдений приведен в табл. 8.

Несомненный интерес представляют результаты параллельной с тестом ППН постановки внутрикожных проб с двумя кожными дозами аллергена гемолитического стафилококка у больных хроническими отитами. Оказалось, что у 76% таких больных реакция кожи на аллерген была отрицательной или сомнительной, несмотря на выделение стафилококка из воспалительного очага в барабанной полости. В отличие от этого тест ППН был отрицательным только у 36,4% больных, т. е. выявлял состояние аллергии в два с лишним раза чаще, чем кожные пробы. По этой причине совпадение диагностически значимых реакций нейтрофилов крови с аналогичными реакциями кожи имело место лишь в 18,5% случаев.

*Оценка аллергии к токсоплазмам.* Применение теста ППН в клинике токсоплазмоза было осуществлено Ю. В. Скавинским (1966, 1970). Специфическим аллергеном являлся токсоплазмин. В качестве контроля использовался специальный препарат, приготовленный Л. И. Грачевой (ИЭМ имени Гамалеи) в соответствии с требованиями методики по изготовлению аллергена и не содержащий инфекционного начала. Концентрация белка в токсоплазмине и контрольном препарате была равнозначной и соответствовала 0,01 г%. Для исследований применялась модификация теста ППН с жидкими аллергенами (разведение в стерильном растворе цитрата натрия: 0,2 мл 25% антикоагулянта на 0,8 мл препарата).

Автор обследовал 50 больных хроническим токсоплазмозом и столько же здоровых лиц. В то время как при инфекционном заболевании среднегрупповой показатель повреждения нейтрофилов был равен 0,41, у лиц контрольного контингента он находился на уровне 0,04, что свидетельствовало о высокой надежности пробы.

*Оценка аллергии к бруцеллам.* Для постановки реакции Ю. В. Скавинский (1964) использовал жидкий бруцеллин. Период инкубации крови в смеси с аллергеном составлял всего 10 мин. В группе практически здоровых людей величина ППН не превышала 0,1. Среди 36 больных бруцеллезом среднее значение показателя составило 0,31, минимальное — 0,22, максимальное — 0,76. Результаты диагностики *in vitro* совпадали с результатами внутрикожных проб с бруцеллином. Несколько позднее аналогичное исследование (инкубация крови 10 мин) было выполнено И. Л. Ка-

саткиной (1967). За норму был принят показатель в пределах 0,15. При показателе от 0,15 до 0,3 тест оценивался как слабоположительный, выше 0,3 — как выраженный. Из 77 больных бруцеллезом у 51 нейтрофильный тест был положительным (выраженная реакция была у 25). У 26 человек проба была отрицательная (значения ППН ниже 0,15). В последней группе 8 больных не реагировали и на пробу Бюрне. Определенное несовпадение между результатами двух работ скорее всего объясняется методическими несовпадениями: в то время как Ю. В. Скавинский обрабатывал мазки крови с помощью гистохимической реакции на гликоген, И. Л. Касаткина окрашивала препараты по Романовскому — Гимзе.

Известные трудности, которые возникают при использовании для теста ППН обычных гематологических способов окраски мазков, излагаются в главе 3.

*Оценка аллергии к листериям.* Листерия является зоонозной инфекцией. Некоторые формы листериоза имеют неблагоприятные исходы. Клиническая диагностика заболевания достаточно трудна из-за отсутствия патогномичных симптомов. В 1967 г. В. В. Дрюккер выполнил экспериментальное исследование, установившее возможность регистрации специфической аллергии у зараженных листериями животных при помощи теста ППН. Для постановки реакции использовался листерийный аллерген. Применение реакции нейтрофилов при листериозе в клинических условиях было осуществлено М. А. Петуховой (1973). Повышенные значения теста ППН были выявлены у 96,9% больных. При этом обнаружилась определенная динамика показателей во времени: на 3—4-й день болезни средний индекс составил 0,15, на 5-й — 0,2, на 9-й — 0,25, на 13-й — 0,31, на 28-й день — 0,37. Повышенная чувствительность нейтрофилов к аллергену регистрировалась и спустя 6 мес. У обследуемых больных значения ППН при использовании бруцеллина и стафилококкового аллергена оставались отрицательными.

*Оценка аллергии к вирусным антигенам.* Разработка методов диагностики специфической аллергии при вирусных инфекциях или после профилактического введения вирусных вакцин представляет собой наименее изученный и наиболее сложный раздел современной аллергологии. Следует иметь в виду, что успешное изучение вирусных заболеваний стало возможным лишь к середине 50-х годов, после идентификации вирусов в морфологическом и функ-

циональном отношении с помощью культур тканей. Оказалось, что вирусы являются не просто облигатными клеточными паразитами, как, например, риккетсии, а паразитами «на генетическом уровне», что в свою очередь предопределяет многоступенчатый механизм их взаимодействия с клеткой (В. Д. Соловьев, И. Г. Баландин, 1973).

При благоприятных для вирионов условиях их проникновение в клетку вызывает первичную патологическую реакцию. Последняя наиболее часто выражается в разрушении клеточных элементов. В части случаев реакция может развиваться по пролиферативному типу, когда пораженная вирусом клетка меняет свою антигенную структуру и обретает черты гетерогенности по отношению к нормальной ткани организма. Частным случаем такой гетерогенизации является состояние злокачественной трансформации. Еще один тип реакции может выражаться в продуцировании веществ, не свойственных жизненным функциям этих же элементов в неинфицированном состоянии. По мнению Luria и Darnell (1968), его следует определить как индуктивный тип и он не обязательно сопутствует указанным выше исходам. Разумеется, характер первичной патологической реакции клеток на внедрившийся вирус может существенно зависеть не только от свойств вирусного штамма, но и от особенностей реактивности макроорганизма. Вполне очевидно, что различные исходы клеточных реакций могут по-разному влиять на формирование иммунитета и, следовательно, на уровень специфической сенсibilизации организма.

Присутствие аллергического компонента наиболее отчетливо обнаруживается в условиях массовой профилактики вирусных инфекций, когда у части лиц в ответ на введение вакцины возникают типичные аллергические осложнения (В. Н. Бондарев, Е. Я. Войтинский, 1972). В 1958 г. С. П. Карпов с сотр., осуществив серию работ, пришли к заключению о необходимости использовать показатели специфической аллергии при клещевом энцефалите для диагностики заболевания и оценки реактивности организма после противознцефалитной вакцинации. В 1960 г. А. Д. Адо и А. Х. Кончурин представили прямые доказательства аллергенных свойств вирусных вакцин. Так, применительно к штамму антирабической вакцины было установлено, что у животных в условиях экспериментального бешенства нервные клетки головного мозга отчетливо изменяют свои антигенные свойства. Различия между нормальной и инфи-

цированной нервной тканью были установлены с помощью методов анафилактики и десенсибилизации, реакции Оухтерлони и связывания комплемента на холоде. Клетки с измененной антигенной характеристикой, возникшей в результате их инфицирования вирусом, были обозначены как промежуточные или вирусиндуцированные (новые) антигены.

Несмотря на успехи экспериментального изучения вирусных инфекций, специфическая диагностика аллергии в клинических условиях широкого распространения не получила. Попытки применить в этих целях реакции кожи на аллергены, полученные методом дезинтеграции и инактивации инфицированных клеточных взвесей, встретили обоснованные возражения: диагностические дозы препаратов сами по себе оказались высокоактивными антигенами. Стало очевидным, что для вирусологической клиники наиболее перспективными должны оказаться методы *in vitro*, в частности тест ППН.

Впервые диагностика вирусной аллергии методом ППН была использована С. П. Карповым (1967). Сенсибилизация кроликов проводилась вирусом клещевого энцефалита, репродуцированным на культуре фибробластов куриного эмбриона в среде № 199 с 0,1% гидролизатом лактальбумина, а также тканевой формолвакциной. В то время как значения ППН в контроле не превышали 0,08, у животных опытной группы они были в 4—7 раз выше (0,28—0,48). В клинических условиях аналогичное заключение было сделано О. А. Васильевой с сотр. (1970): на 5—7-е сут заболевания клещевым энцефалитом выраженность ППН достигала 0,2—0,3. У контингентов, привитых инактивированной сорбированной вакциной против клещевого энцефалита, повышение интенсивности реакции нейтрофилов обнаруживалось спустя 30—60 дней. В обеих описанных работах в качестве антигена в тесте ППН использовали вирусную вакцину. Авторы высказали мнение, что тест ППН может найти применение для дополнительной характеристики вирусных вакцин.

## Тест ППН при аутоиммунных процессах

Успехи современной иммунологии позволили аллергологам и клиницистам приблизиться к пониманию патогенеза большой группы заболеваний, включающей в себя пораже-



ния внутренних органов (сердце, легкие, печень, почки), первой системы, крови и соединительной ткани. Объединяющим для них компонентом явилось состояние повышенной чувствительности к измененным тканевым элементам собственного организма. Такого рода процессы возникают в результате повреждения клеток инфекционным агентом (например, энцефалиты), вследствие нарушений кровообращения, термических и ионизирующих воздействий.

Диагностика аутоиммунных процессов, равно как и оценка их активности, сложна. С одной стороны, имеются указания на циркуляцию в организме здоровых людей незначительных количеств противотканевых антител. С другой стороны, не при всех случаях аутоиммунных заболеваний титр специфических противотканевых антител достаточно высок для регистрации положительных иммунологических проб. В этой же связи следует отметить точку зрения А. Д. Адо (1970) о том, что характер действия аутоантител вытекает из количественного соотношения между ними и аутоантигеном: цитотоксический эффект обычно проявляется при относительно невысоком содержании антител, а при их высоком титре взаимодействия комплемента с комплексом антиген — антитело не происходит.

*Тест ППН в клинике нервно-психических заболеваний.* Работами последних лет было показано, что при шизофрении и других нервно-психических процессах в крови больных обнаруживаются противомозговые антитела. Ряд авторов допускают участие некоторых циркулирующих антител в цитотоксических реакциях с определенными «забарьерными» антигенами, ограничивая их от протективных антител. Внутривенное введение антигенов из ткани мозга установило наличие к ним у многих больных повышенной чувствительности, развивавшейся по замедленному типу. Эта чувствительность рассматривалась как следствие аутоаллергических процессов, сопутствующих патогенезу демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы. Следует указать, что расшифровка аутоаллергических сдвигов при нервно-психических заболеваниях только начинается и она исключительно сложна. Учитывая, что ткани мозга отличаются неоднородным «иммунологическим профилем» и включают в себя органнне, видовые, органоидные и групповые антигены, Н. И. Кузнецова (1970) осуществила специальное иммунологическое исследование

и обнаружила в крови указанной группы больных антитела трех основных типов: 1) к антигенам, общим для человека и животных; 2) к антигенам мозга некоторых видов животных, но не к антигенам мозга человека; 3) к антигенам мозга человека, но не гетерологичного в видовом отношении мозга (крысы). Появление в крови больных столь различных по своей природе антител Н. И. Кузнецова связывает с развитием патологического процесса и как следствие этого демаскировкой входящего в состав мозга человека гетерогенного органоспецифического антигена.

В клинике, руководимой С. Ф. Семеновым, А. П. Чуприков (1966) выполнил исследование, цель которого состояла в диагностическом применении разработанной нами реакции нейтрофилов у больных шизофренией. В качестве антигенов автор использовал стерильные водно-солевые экстракты мозга здоровых лиц, погибших от случайных причин. Для приготовления препаратов были взяты такие морфологические структуры мозга, как белое вещество больших полушарий, серое вещество лобной коры, зрительный бугор, мозжечок, а также гетерологичный мозг крысы, экстракты которого ранее применялись для оценки противомозгового иммунитета.

В опытные пробирки стерильными микропипетками вносили 0,02 мл тканевых антигенов, разведенных 5% раствором цитрата натрия до концентрации 850—900 мкг белка на 1 мл цельной крови. Контрольные пробирки содержали 0,02 мл 5% цитрата натрия с консервантом — 0,05% карболовой кислотой. Последняя постоянно входила и в состав тканевых экстрактов. Условия инкубации, приготовления и обработки мазков, а также оценка реакции нейтрофилов крови ничем не отличались от уже описанного в начале главы метода. А. П. Чуприков приводит результаты обследования 171 человека: больных шизофренией (101), больных с органическими поражениями головного мозга сосудистого и травматического характера (40), психически и неврологически здоровых лиц (30). Значения теста ППН у здоровых людей (138 исследований) не выходили за пределы 0,04—0,05. В то же время у 74 больных шизофренией (73,2%) реакция нейтрофилов на антигены мозга была повышенной или высокой (0,1 и более), достигая у отдельных лиц 0,4—0,5. Значения ППН от 0,1 до 0,15 А. П. Чуприков рекомендует считать слабоположительной реакцией, 0,16—0,2 — положительной, от 0,21

и выше — резко положительной реакцией. Исследования с использованием экстрактов печени дали отрицательные результаты.

*Тест ППН в клинике хронических заболеваний легких.* Хронические заболевания бронхо-легочного аппарата независимо от их этиологии сопряжены с деструктивными изменениями легочной паренхимы. Вопросы так называемой неспецифической иммунологии при туберкулезных, эхинококковых и других поражениях легких начали изучаться сравнительно недавно. Уже первые наблюдения показали, что при деструктивных туберкулезных процессах в крови большинства больных обнаруживаются антитела к гомологичной легочной ткани, причем их титр доходит до 1 : 1280. Обширные исследования в этом направлении были осуществлены М. И. Китаевым и В. Л. Морозовым (1970).

Анализ почти 600 исследований показал, что некротизация легочной ткани, обусловленная инфекционным (в данном случае туберкулезным) процессом, ведет к наиболее интенсивной выработке противолегочных антител. Их высокие титры регистрировались и в период обострения бронхиальной астмы (Г. Б. Федосеев, 1968), которая, как это теперь хорошо известно, имеет в большинстве случаев инфекционно-аллергическую природу.

Развивая исследования, направленные на выяснение роли аутоаллергии в патологии легких, М. И. Китаев и И. Б. Засухина (1970) оценили диагностические возможности ППН, используя в качестве антигена водно-солевой экстракт резецированных интактных легких. При постановке реакции 0,08 мл крови вносили в пробирку с 0,1 мл смеси, включавшей в себя 5% раствор цитрата натрия и 10% раствор водно-солевого экстракта интактных легких или других (в качестве контроля) внутренних органов в соотношении 1 : 4. Концентрация белка в тканевых экстрактах составляла 2%. Внутренние органы были получены от доноров с первой группой крови. Плацентарную ткань брали от женщин с резусотрицательным фактором крови. Для получения препарата из почек применяли орган мертворожденного ребенка, погибшего от внутриутробной асфиксии. Используемые ткани 8—10 ч тщательно отмывали от крови проточной водой и отжимали. Растирание взвешенной ткани происходило в ступке с толченым стеклом, куда постепенно приливали физиологический раствор до соотношения 1 : 10. Смесь сутки выдерживали при +4° и цент-

рифугировали 45 мин при 5000 об/мин. Все фильтраты надосадочных жидкостей хранили при минусовой температуре в испарительной камере холодильника. Контрольная проба содержала кровь и антикоагулянт без антигена. Дальнейшие этапы реакции (инкубация крови, обработка мазков, учет реакции) соответствовали описанной выше схеме, общей для всех аллергенов.

В процессе обследования 242 человек было установлено существование повышенной чувствительности нейтрофилов к антигенам легкого у больных туберкулезом ( $0,24 \pm 0,01$  при  $p < 0,01$ ). У больных силикозом реакция была значительно ниже ( $0,12 \pm 0,01$ ), хотя по сравнению с практически здоровыми людьми ( $0,03 \pm 0,001$ ) различия и здесь были вполне достоверны ( $p < 0,05$ ). Лечение больных туберкулезом в продолжение 3—4 мес и переход процесса в фазу затихания сопровождалось существенным ослаблением чувствительности нейтрофилов к легочному экстракту ( $0,04 \pm 0,03$ ).

Одновременное изучение у больных туберкулезом чувствительности к туберкулину при помощи теста ППН позволило авторам прийти к заключению об определенном параллелизме в динамике проявлений инфекционной аллергии и аутоаллергии. Водно-солевой экстракт легкого был использован и для оценки аутоаллергических сдвигов в организме больных бронхиальной астмой (Г. В. Гургенидзе, Л. О. Киласония, 1971; Л. О. Киласония, 1972). При этом авторы исходили из предположения, что при некоторых формах бронхиальной астмы определенную роль играет эндоаллергизирующий компонент, непосредственно не связанный с микробными антигенными детерминантами. Одновременно был рассмотрен вопрос о патогенетическом значении гуморальных и клеточных факторов, сопутствующих процессам аутоенсибилизации. Применение в этих целях теста ППН показало, что в период обострения бронхиальной астмы реакция нейтрофилов к антигену легочной ткани оказалась повышенной в среднем до  $0,32 \pm 0,01$ . При переходе острой фазы в подострую значения ППН снижались ( $0,24 \pm 0,01$ ). Среди контрольного контингента больных этот же антиген не вызывал реакции ( $0,04 \pm 0,06$ ).

Возможность регистрации проявлений аутоенсибилизации при заболеваниях легких позволяет рассчитывать на широкое применение теста ППН в пульмонологической практике.

## ТЕСТ АЛЬТЕРАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ

В отличие от критерия амебондной активности нейтрофилов данный тест основан на учете внутриклеточных дегенеративных изменений, возникающих в результате инкубации крови в смеси с аллергеном. Одной из первых работ на этом пути явилось исследование Witte (1950). Разливая венозную кровь по небольшим пробиркам, он оценивал морфологические изменения лейкоцитов при воздействии разных туберкулинов с учетом фактора времени (от 90 мин до 24 ч). Автор отметил, что даже в неизмененных препаратах часто наблюдались ядра, хроматиновая структура которых казалась несколько гомогенизированной. В дальнейшем дегенерация ядер нарастала (пикноз, огрубение хроматиновых структур, чрезмерная сегментация). Особенно причудливыми оказывались фигуры ядер нейтрофилов (образование лент). В цитоплазме нейтрофилов появлялись многочисленные вакуоли. Исключение составляли эозинофилы, в которых изменения не обнаруживались. Witte сообщает, что распад лейкоцитов под воздействием туберкулина начинался с распада гранулоцитов. Что же касается лимфоцитов и моноцитов, то большая их часть преобразовывалась в элементы, обозначенные как моноцитониды. Следует думать, что в этом случае автор наблюдал начальные фазы бласттрансформации мононуклеаров. В работе подчеркиваются два обстоятельства: 1) изменения лейкоцитов больных туберкулезом людей без добавления туберкулина не отличались от изменений лейкоцитов здоровых лиц; 2) у здорового персонала туберкулезного санатория интенсивность вакуолизации нейтрофилов при контакте с туберкулином часто оказывалась значительно более выраженной, чем у других лиц контрольной группы.

Оригинальная методика была предложена Black (1956). На предметное стекло наносили каплю дистиллированной воды, в которой перед этим растворяли один из высушенных белковых антигенов небактериальной природы (молоко, пшеница, шерсть животных и т. д.), а затем (после высушивания растекшегося антигена) каплю нейтральной краски. Препарат вновь подсушивали. После этого на покровное стекло переносили каплю плазмо-лейкоцитарной

суспензии, полученной в результате центрифугирования гепаринизированной крови. На покровное стекло наносили каплю суспензии. Покровное стекло накладывали на предметное стекло так, чтобы капля приходилась на зону высушенного антигена. Жидкую камеру герметизировали с помощью жировой смазки краев и инкубировали при 37°. Оценка реакции нейтрофилов состояла в учете цитотоксического эффекта: уменьшения и прекращения внутриклеточного броуновского движения, гиперхроматоза внутриклеточных структур, диффузии краски из гранул в цитоплазму. В части проб выраженный цитотоксический эффект наступал в первые 2½ ч. Иногда гибель лейкоцитов наблюдалась в течение первых 60 мин.

В 1963 г. нами совместно с М. И. Стенко были опубликованы результаты работы, в которой регистрация специфического повреждения полиморфноядерных лейкоцитов также была сопряжена с оценкой внутриклеточных дегенеративных изменений. В течение первых 2 ч инкубации крови, взятой от сенсibilизированных больных, видимой реакции со стороны лимфоцитов и моноцитов на аллерген не обнаружилось. При учете повреждения нейтрофилов объем и способ получения крови, условия ее консервации и инкубации с аллергеном и в контроле, а также техника приготовления препаратов в точности соответствовали требованиям, изложенным при описании теста ППН. Окраска приготовленных и подсушенных на воздухе мазков производилась по Паппенгейму—Крюкову. Помимо четкой дифференцировки внутриклеточных структур, данный способ исключает этап предварительной фиксации. Окраска препаратов начинается с нанесения на опытные и контрольные мазки крови цельного раствора красителя — фиксатора Май-Грюнвальда (экспозиция 3 мин). Затем на поверхность мазков приливают воду в объеме, равном ранее налитому красителю. Спустя 1 мин разбавленный водой краситель сливают и без прополаскивания на мазки наливают (на 10—12 мин) краситель Романовского—Гимзы (15 капель цельного красителя на 10 мл воды). После промывания мазков под струей воды и подсушивания на воздухе они могут использоваться для иммерсионной микроскопии. Окраска мазков может быть произведена и другими способами. Н. В. Николаева с сотр. (1972) использовали метод Романовского.

Для оценки альтерации нейтрофилов в каждом препарате под иммерсией просматривается 100 клеток. Рекомен-

дуются для подсчета просматривать те зоны мазка, которые были указаны для теста ППН. В процессе подсчета нейтрофилы делят на две категории: а) клетки, в которых отсутствуют видимые изменения, а также клетки с небольшим фрагментированием или пикнозом ядра, захватывающим лишь его отдельные сегменты, иногда с частичным хроматинолизом; б) клетки с отчетливым хроматинолизом, а также с выраженным пикнозом или фрагментацией ядра. Возможен гиперхроматоз и кариолиз. К этой же категории относятся и нейтрофилы с различной степенью цитолиза, включая полный распад клеток (остатки ядерного вещества и зернистости). Целесообразность такого разграничения клеток вытекает из того факта, что начальные изменения нейтрофилов, причисленные к категории «а», достаточно часто обнаруживаются после 2-часовой инкубации и в контрольных препаратах. По этой причине оценка повреждающего действия аллергена обязательно должна увязываться с выраженными изменениями клеток (категория «б»). Число обнаруженных полиморфноядерных лейкоцитов с изменениями последней категории в контрольном препарате ( $H_2$ ) вычитается из аналогичного числа, полученного при подсчете опытного мазка ( $H_1$ ), и делится на 100. Полученный показатель и характеризует интенсивность специфической альтерации нейтрофилов крови 
$$\left( A = \frac{H_1 - H_2}{100} \right).$$

Следует заметить, что специальными сопоставлениями была установлена меньшая выявляемость амебоидной активности нейтрофилов при применении обычных гематологических окрасок мазков крови по сравнению с гистохимической реакцией на гликоген.

Оценка реакции альтерации нейтрофилов связана с известными трудностями: 1) характеристика внутриклеточных дегенеративных изменений является многоплановой и требует от персонала специальной подготовки в области гематологии; 2) выраженность ряда критериев (степень фрагментации и хроматинолиза) в определенной мере может зависеть от качества красителя, стандартности его приготовления и техники обработки мазков.

П. Н. Сахаровым, Е. И. Гудковой и Г. П. Кудриной (1969) на основании обследования 42 больных (20 мужчин, 22 женщины) было высказано мнение, что критерии повреждения нейтрофилов аллергенами могут быть дополнены учетом добавочных ядерных долек в виде «барабанных палочек». Авторы пришли к выводу, что степень специфич-

ческого повреждения лейкоцитов находится в тесной корреляции с обнаружением «барабанных палочек» в ядрах клеток. Между тем установлено, что выросты на ядрах лейкоцитов, напоминающие барабанные палочки, являются образованиями, связанными с половой спецификой клеток. Как правило, они обнаруживаются только у женщин, и при этом скопление хроматина, соединяющегося с сегментом ядра хроматиновой нитью, встречается в норме не часто: в среднем одно ядро с «барабанной палочкой» на 46 обычных ядер. Именно поэтому данный тест является критерием для судебно-медицинской экспертизы при установлении пола человека по капле крови (С. И. Любинская, 1969).

Тест альтерации нейтрофилов использовался нами для характеристики аллергии к туберкулину у 85 взрослых больных туберкулезом легких и 16 здоровых, составивших контрольную группу. Наиболее высокие показатели повреждения клеток наблюдались у больных в период обострения (вспышки) процесса —  $M$  средняя равнялась 0,52. В фазе затихающей вспышки аналогичный показатель составил 0,31, а в контрольной группе — 0,18. Различия между показателями в каждой из трех групп оказались статистически достоверными. Было отмечено, что изменения клеток по типу их полного распада чаще всего обнаруживались при клиническом обострении туберкулеза легких (в 21% случаев). В мазках крови практически здоровых людей такие повреждения вообще отсутствовали.

Сопоставляя полученные данные с показателями теста ППН (оценка амебоидной активности нейтрофилов в мазках крови после проведения реакции на гликоген), следует обратить внимание на более высокие показатели при учете внутриклеточных дегенеративных изменений. Это в первую очередь касается контрольного контингента людей. Если при использовании ППН среднегрупповой показатель контрольной группы был равен 0,06, то в тесте альтерации нейтрофилов он достигал 0,18, т. е. был в 3 раза выше. В этой связи в первом случае (тест ППН) среднеконтрольный индекс был ниже индексов, характерных для «вспышки» процесса, в 5 раз, а для индексов при затихающей «вспышке» — в 4 раза (0,3; 0,23; 0,06). При учете же реакции по признакам внутриклеточных дегенеративных изменений различия оставались в пределах троекратных и менее чем двукратных величин (0,52; 0,31; 0,18). О различиях в принципиально совпадающих диапазонах сообщила Р. Г. Гудко-



ва (1967). Она отметила, что у больных бронхиальной астмой при максимально выраженных реакциях кожи на аллергены гемолитического стрептококка и стафилококка, кишечной палочки и вульгарного протей средний показатель повреждения лейкоцитов был равен 21%, а при отсутствии реакции на аллергены — 9,8%. Тест альтерации нейтрофилов с аллергенами гемолитического стрептококка, стафилококка и кишечной палочки был использован также и при обследовании больных с острыми нейроинфекционными процессами: серозными менингитами, энцефалитами и др. (И. Л. Богданов и др., 1972). Среди больных с аллергическими сопутствующими заболеваниями в анамнезе (хронические тонзиллиты, ангины) положительные значения теста обнаруживались в 2—3 раза чаще, чем среди остальных больных.

Н. В. Николаева и соавт. (1972) обследовали в клинике туберкулеза по описанной нами методике альтерации нейтрофилов 123 ребенка в возрасте от 2 до 14 лет. Авторы отметили, что сочетание повышенной реакции со стороны нейтрофилов с клинико-рентгенологическими изменениями имело место в 76,6%. Низкие значения теста (в пределах показателей, характерных для здоровых детей — 0,02) наблюдались у части больных с небольшими изменениями в легких (незначительное увеличение корней легкого, плевральные наслоения). В условиях динамического наблюдения было обнаружено, что спустя 3—6 мес у детей происходила нормализация чувствительности нейтрофилов к туберкулину.

Если в группе больных с активным процессом реакция нейтрофилов при поступлении не была повышена у 4 человек из 25, то по окончании лечения она была в норме у 19, а у остальных показатель не превышал 0,08. Говоря о не слишком высоких индексах повреждения нейтрофилов при первичном обследовании больных детей по сравнению со взрослыми, авторы справедливо обращают внимание на тот факт, что в клинику дети обычно поступают уже после предварительного лечения. Между тем, как следует из наших материалов использования теста ППН, лечение детей достаточно быстро ведет к резкому снижению чувствительности нейтрофилов к туберкулину.

Работа Н. В. Николаевой с сотр. примечательна тем, что для диагностики *in vitro* ими использовалась весьма высокая концентрация аллергена: в 1 мл 5% раствора цитрата натрия они растворяли не одну, а пять ампул су-

хого туберкулина. Если допустить, что аллерген имел стандартную активность, то можно сделать вывод, что повышение концентрации препарата сверх оптимального уровня не ведет к усилению деструктивных процессов в клетке в первые 2 ч инкубации крови.

## Г л а в а 4

### ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО «ПОВРЕЖДЕНИЯ» ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

---

Диагностическое применение специфических реакций лейкоцитов крови на внесение в среду аллергенов бактериального или небактериального ряда определяет постоянный интерес исследователей к методам регистрации изменений в структуре или функциональной активности этих элементов. Рядом авторов были предприняты попытки использовать для просмотра препаратов люминесцентную микроскопию. Отличительной чертой метода люминесценции является достаточно высокая контрастность наблюдаемых объектов. При витальной обработке клеток флюорохромами исследователь имеет возможность охарактеризовать не только морфологическое, но отчасти и функциональное состояние лейкоцитов, поскольку в разных условиях они поглощают или фиксируют на своей поверхности различное количество красителя. К числу таких работ и относятся исследования Н. В. Медуница, В. Б. Гервазиевой (1967), В. Б. Гервазиевой (1968). Методом витального флюорохромирования они оценивали повреждение и степень поглощения акридинового оранжевого лейкоцитами крови в реакциях немедленного типа у больных поллинозами. При этом использовались аллергены из пыльцы тимopheевки луговой, ольхи серой, дуба и амброзии полыннолистной.

Использованная В. Б. Гервазиевой методика прямой реакции альтерации лейкоцитов заключалась в следующем: 1) в две небольшие силиконизированные пробирки вносят по 0,45 мл крови с антикоагулянтом (соотношение 2 : 1), в качестве которого используют 1,5% раствор двуназиевой соли ЭДТА («Хелатон-3») в 0,7% физиологическом раство-

ре (рН не выше 8,0 во избежание неспецифического лизиса лейкоцитов); 2) в опытную пробирку добавляют 0,05 мл свежеприготовленного аллергена (разведенного 1 : 10 раствором Симмса), на который у больного ранее регистрировалась выраженная реакция кожи. В контрольную пробирку вносят такое же количество аллергена, на введение которого реакция кожи была отрицательной. Содержимое пробирок осторожно перемешивают. Пробирки оставляют на 1 ч при комнатной температуре; 3) перед флюорохромированием содержимое пробирок вновь осторожно перемешивают и к нему добавляют по 0,05 мл (экспозиция 5 мин) солевого раствора акридинового оранжевого в разведении 1 : 20 000. Основной раствор акридинового оранжевого готовят на дистиллированной воде (1 : 1000). Активность его остается достаточной в течение многих месяцев при хранении в темноте при 5°. Для приготовления рабочего разведения акридинового оранжевого 1 : 20 000 (с рН не ниже 6,3) используется солевой раствор Симмса. Рабочее разведение пригодно для работы в течение 1—2 нед; 4) каплю смеси из опытной и контрольной пробирок (по истечении 5-минутной окраски клеток) наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и исследуют в люминесцентном микроскопе спустя 3—5 мин — в период, когда лейкоциты располагаются в силу тяжести в одной плоскости. Производят подсчет 1000 гранулоцитов, определяя процент поврежденных элементов.

При витальной микроскопии обработанных флюорохромом лейкоцитов было установлено, что они сохраняют шаровидную форму. Нейтрофилы характеризовались обилием рубиновых гранул на фоне тускло-зеленого свечения цитоплазмы. Отличительными признаками эозинофилов являлись характерное ядро и несколько укрупненные гранулы в цитоплазме. Лимфоциты обладали изумрудным свечением ядер, тускло-зеленой цитоплазмой с одиночными красными зернами в ней. Отличие лейкоцитов в опытных препаратах заключалось не в характере свечения клеток, а в отчетливых морфологических изменениях со стороны гранулоцитов. В. Б. Гервазиева (1968) выделяет клетки с тремя категориями изменений: 1) клетки с неровными, «разорванными» краями и начинающимся по краям разрежением цитоплазмы; 2) клетки, в которых к указанным выше изменениям в краевых зонах цитоплазмы присоединяются ее вакуолизация и явления дегрануляции; 3) клетки, в которых наблюдалась потеря цитоплазмы и огрубение хрома-

тинового рисунка ядра. При просмотре опытных мазков среднее количество поврежденных гранулоцитов составляло 58—69%. Контрольные аллергены вызывали альтерацию клеток в пределах 7%.

Методом последовательной фотометрии негатива изображения клетки с автоматической регистрацией объекта на микрофотометре МФ-4 И. В. Медуницину и В. Б. Гервасьевой (1967) удалось показать, что в опытных препаратах внешне неизменные клетки отличались большей интенсивностью свечения. Свечение поврежденных клеток было ослабленным.

Говоря об использовании методов прижизненной оценки альтерации лейкоцитов в люминесцентном микроскопе, нельзя не отметить, что их применение в практике лечебных учреждений наталкивается на трудно преодолимые препятствия. Они вытекают из необходимости соблюдать весьма незначительные интервалы времени между внесением в кровь флюорохрома и началом микроскопии. Между тем при первичном обследовании больных обычно приходится использовать не один, а несколько аллергенов. Это обстоятельство определяет большую ценность пробы при динамических наблюдениях, когда специфический аллерген уже установлен.

Сотрудники нашей лаборатории А. В. Давыдова и С. Ф. Радунская (1973) провели специальное исследование, цель которого состояла в выборе таких условий для оценки вторичной люминесценции нейтрофилов в мазке крови, которые позволяли бы достаточно отчетливо регистрировать их амебoidalную активность. При разработке ими методики условия взятия крови, ее консервация, подбор оптимальной концентрации аллергена (сухой очищенный туберкулин), время инкубации крови и требования к приготовлению мазков ничем не отличались от таковых при постановке теста ППН с использованием реакции на гликоген. Готовые тонкие мазки крови фиксировали метиловым спиртом или раствором Карнуа и окрашивали флюорохромами, применяемыми в практике люминесцентной микроскопии для выявления клеточных структур: акридиновым оранжевым, ауорофосфином, корифосфином, родамином, трипафлавином, примулином, аурамином О, фуксином. Маточные растворы флюорохрома готовили в разведении 1 : 1000 на дистиллированной воде и затем использовали их в рабочем разведении. Мазки окрашивали разными флюорохромами в течение 3—10 мин, промывали в воде, закрывали покровным

стеклом и изучали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 в видимых синих лучах с объективами  $\times 40$  и масляной иммерсией  $\times 90$ .

Наблюдения показали, что амебонидная реакция нейтрофилов в фиксированных мазках крови наиболее стабильно регистрировалась при последовательной окраске примулином (раствор 1 : 10 000, 10 мин) и акридиновым оранжевым (раствор 1 : 100 000, 3 мин), разведенными на физиологическом растворе при pH 5,2—5,4. Эритроциты при этом не флюоресцировали, а лишь слабо контурировались в виде темных пустот. Не отмечалось и свечения тромбоцитов. В противоположность этому и нейтрофилы и лимфоциты хорошо обнаруживались благодаря зеленому свечению ядра и желтому свечению цитоплазмы. Нормальные нейтрофилы имели овальную или круглую форму. «Поврежденные» клетки распознавались по характерным амебонидным выпячиваниям.

## Г л а в а 5

### РЕАКЦИЯ БАЗОФИЛОВ ПО ШЕЛЛИ

---

Реакция базофилов относится к числу проб, в которых лейкоциты используются в качестве клеток-индикаторов, непосредственно участвующих в проявлении аллергических реакций, развивающихся по типу гиперчувствительности немедленного типа. Интерес аллергологов к данному тесту был обусловлен прежде всего возможностью выявления с его помощью *in vitro* кожносенсибилизирующих антител человека — реагинов.

В связи с незначительным количеством базофилов в периферической крови их присутствие в мазке обычно не регистрируется. Для обнаружения базофилов принято пользоваться методом абсолютного подсчета клеток в счетной камере. Специальные наблюдения Shelley (1963), Т. И. Серовой (1973) и других авторов показали, что у больных аллергическими заболеваниями (до начала курса специфической гипосенсибилизирующей терапии) среднее количество базофилов достоверно выше, чем у здоровых людей.

При разработке базофильного теста Shelley исходил из хорошо известного факта: все основные клинические симптомы анафилаксии могут быть вызваны введением в организм гистамина. Была высказана гипотеза, что в результате взаимодействия с антигеном базофильные лейкоциты повреждаются и освобождают гистамин, представляя, таким образом, модель анафилаксии в миниатюре.

Вероятность такого объяснения увеличилась после того, как были сообщены данные о распределении гистамина в лейкоцитах и в жидкой среде после инкубации всей этой «системы» с аллергеном (Pruzansky, Patterson, 1967). В то время как в контрольных исследованиях в ядрах и гранулах клеток обнаруживалось 84% всего гистамина, после инкубации лейкоцитов с аллергеном эти же структуры содержали только 11% медиатора. Однако первоначальная точка зрения, что следствием реакции антиген—антитело являются дегрануляция и разрушение базофилов, а отсюда и повышение концентрации в крови гистамина и других активных веществ, в последние годы пересматривается в пользу секреторной теории, которая утверждает, что разрушение базофилов наблюдается сравнительно редко. Обычная же форма ответной реакции клеток на аллерген состоит в интенсивной секреции биологически активных веществ, и эта функция присуща жизнеспособным и функционально активным базофилам. В этой связи уместно упомянуть об экспериментах Cruickshank с сотр. (1968), которые, применив различный температурный режим, смогли ограничить дегрануляцию базофилов от освобождения этими же клетками гистамина. В 1969 г. Levy опубликовал результаты исследования, в ходе которого в лейкоциты поступал из буферного раствора калий с радиоактивной меткой. Следовавшая за этим дополнительная инкубация со специфическим аллергеном сопровождалась интенсивным поступлением в среду гистамина, однако ощутимой потери калия не наступало. Механизм секреции гистамина в результате специфического взаимодействия лейкоцитов с аллергеном в определенной мере раскрывают и работы Lichtenstein, Osler (1964) и др., о которых более подробно будет сказано в главе 11.

В связи с тем что в проверочных работах (Friedlaender, 1964, и др.) обнаружилась недостаточно четкая корреляция между выраженностью дегрануляции базофилов и проявлениями специфической аллергии у больных, критерии теста по Шелли были дополнены оценкой расположения гранул,

учетом появляющихся псевдоподий и изменения их формы (скручиваемость), вакуолизации цитоплазмы, гиперхроматизации. Исследователи обратили внимание и на затруднения, связанные с незначительным количеством базофилов в крови людей (обычно до 0,5%). Кроме того, как неоднократно отмечалось в литературе, при аллергических кризах уровень базофилов в крови людей резко падает вплоть до их временного исчезновения. Причины базофилопении все еще остаются неясными. Допускается, что вследствие интенсивной дегрануляции базофилы не прокрашиваются и перестают обнаруживаться. Существует точка зрения о задержке базофилов в поражаемых аллергическим процессом тканевых системах. Перечисленные обстоятельства и явились причиной того, что в практике аллергологических кабинетов прямая реакция базофилов не нашла сколько-нибудь широкого применения. Значительно большее распространение получил непрямой базофильный тест. Уже на первых этапах изучения реакции базофилов Shelley (1963) обратил внимание на возможность воспроизведения феномена в условиях инкубации лейкоцитов здорового человека в присутствии аллергена и сыворотки, полученной от больного, у которого к данному аллергену имелась высокая чувствительность. Эта схема и была использована в его дальнейшей работе, но с заменой лейкоцитов здорового человека лейкоцитами нормального животного.

Фундаментальное исследование в области изучения аллергии к растительной пыльце у больных поллинозами с использованием непрямого базофильного теста было выполнено А. А. Польнером (1971) в лаборатории, руководимой А. Д. Адо. Оно показало, что степень дегрануляции базофилов достоверно коррелирует с уровнем реагинов. Регистрация последних осуществлялась пробой Прауснитца—Кюстнера. Реагины в сыворотке крови человека, появлявшиеся в процессе спонтанной сенсибилизации организма аллергенами растительной пыльцы, имели константу седиментации порядка 7S. В то же время титры гематтлютинирующих антител при высокой сенсибилизации больных поллинозами были низкими. Рост их имел место в процессе специфической гипосенсибилизирующей терапии больных.

По мнению А. Д. Адо (1966) и др., реагины характеризуются «биспецифичностью», что ведет к их прочной связи не только с аллергеном, но и с некоторыми клеточными

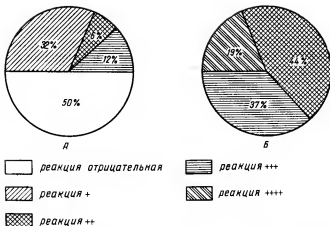


Рис. 13. Результаты непрямого базофильного теста без подбора оптимальных концентраций сыворотки крови больного поллинозом и аллергена (А) и при оптимальных концентрациях (В) (по Т. И. Серовой, 1973).

элементами, в частности с клетками мастоцитобазофильной системы (Л. М. Ишимова, 1971, и др.). С этих позиций находит объяснение факт сохраняющейся секреции гистамина, несмотря на трехкратное отмывание базофилов после их контакта с аллергеном (Middleton, Sherman, 1960).

До последнего времени неясными оставались причины, по которым базофилы крови ряда больных с установленным диагнозом аллергии не реагировали на внесение в среду специфического аллергена. Изучение этого вопроса было предпринято Т. И. Серовой (1973). Продолжая наблюдения А. А. Польнера, она испытывала в реакции не только максимальные концентрации аллергенов и антител, но и их разведения, пытаясь в каждом отдельном случае найти оптимальные соотношения этих ингредиентов. Кроме исходных концентраций аллергенов (3 г на 100 мл экстрагирующей жидкости Кока), использовались разведения 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125. Сыворотки больных разводились 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. При индивидуально-оптимальных концентрациях аллергена и сыворотки все отрицательные пробы становились положительными (рис. 13).

Обсуждение причин, по которым возникают отрицательные базофильные тесты, должно быть дополнено сведениями

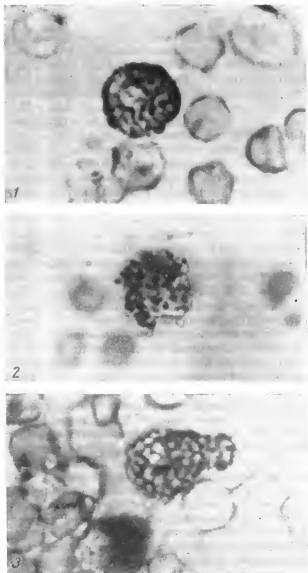


ми о роли блокирующих антител. Последние появляются в крови больных в результате специфической гипосенсибилизирующей терапии. По мнению А. А. Польнера (1968), эти антитела, являясь антиантителами против реагинов, способны блокировать аллерген и предотвращать его контакт с реагинами. По наблюдениям А. Д. Адо и М. А. Жуковского (1965), блокирующие антитела в сыворотке больных содержатся в глобулиновых фракциях.

Говоря о характере реакции базофилов крови кролика при постановке непрямого теста по Шелли, А. А. Польнер (1971) выделяет три стадии: латентный период (10—15 мин), период активации (15—20 мин) и возвращение клетки в состояние относительного покоя. Существование последней стадии выявилось при микрокино съемке и подтвердило данные, полученные нами в аналогичных условиях при изучении в камере с жидкостью реакции повреждения нейтрофилов крови под воздействием аллергена (В. А. Фрадкин, 1967). Таким образом, вся совокупность исследований не подтвердила разрушения гранулоцитов по типу «взрыва» в течение первых часов инкубации клеток с аллергеном. Применительно к базофилам из этого следует весьма важный вывод: то состояние элементов, которое до последнего времени оценивалось как «дегрануляция», является по существу лишь одной из стадий в реакции клетки, стадией «гранулокинезиса» и амeboидной активности (рис. 14).

Методика непрямого дегрануляции базофилов, использованная А. А. Польнером (1971), предусматривала применение свежей сыворотки крови обследуемого лица или сыворотки, сохранявшейся при температуре не выше  $-20^{\circ}$ .

Взвесь лейкоцитов кролика автор получал путем отсасывания беловатой лейкоцитной пленки, возникающей между слоем эритроцитов и плазмой после центрифугирования гепаринизированной крови в узких пробирках (5 мин при 3000 об/мин). Кровь в объеме 2—3 мл получают у кроликов путем легкого надсечения краевой вены уха, ближе к ее основанию. Используемые для этой цели животные должны быть здоровы. Наиболее стабильные результаты получаются при использовании белых новозеландских кроликов. Поскольку у кроликов иногда обнаруживается спонтанная дегрануляция базофилов, их кормление перед получением крови (в целях снижения такой вероятности) не проводится.



**Рис. 14. Реакция Шелли (непрямая дегрануляция базофилов).**

1 — базофилы кролика в контрольном препарате; 2 — дегрануляция базофила кролика в присутствии сыворотки больного поллинозом и специфического аллергена; 3 — amoeboidная реакция базофила кролика в присутствии сыворотки больного поллинозом и специфического аллергена (по Т. И. Серовой, 1973).

Для постановки непрямой базофильной пробы на обезжиренное предметное стекло наносят 0,3% спиртовой раствор нейтрального красного. Раствор готовят на абсолютном спирте (в 100 мл растворяют 300 мг красителя и спустя сутки раствор фильтруют). Нанесенный на стекло красящий раствор подсыхает, после чего на этот же участок наносят равные количества (по 0,05 мл) сыворотки больного, кроличьей сыворотки и рабочей концентрации аллергена. Ингредиенты осторожно перемешивают и накрывают покровным стеклом, края которого смазаны вазелином. Препараты инкубируют не более 10—15 мин при 37°. Параллельно ставят две контрольные пробы: с аллергеном, но без сыворотки больного и с сывороткой, но без аллергена. Единого мнения об условиях и сроках хранения сыворотки больного нет. В то время как Sidi и сотр. (1964) хранили сыворотку при нулевой температуре в течение нескольких месяцев, другие исследователи содержали ее при —20°. Shelley отдает предпочтение свежим сывороткам, указывая, что лабильность антител может привести как к уменьшению числа положительных реакций, так и к ложноположительным пробам. Если исходить из наблюдений Osler и сотр. (1968), которые показали, что присутствие термолабильных фракций комплемента не является обязательным для воспроизведения реакций лейкоцитов при полинозах [Т. И. Серова (1973), изучая базофильный тест, это подтвердила], то кратковременное хранение сывороток при минусовой температуре вряд ли необходимо. Что же касается лекарственных средств или аллергенов, то основные требования, которые к ним предъявляются, состоят в подборе оптимальной концентрации каждого наименования препарата и в том, чтобы в процессе приготовления они хорошо растворялись в воде. Аллергены не должны содержать каких-либо консервантов.

При суправительной окраске нейтральным красным гранулы базофилов приобретают кирпично-красный цвет. Остальные лейкоциты окрашены в светло-желтые тона. Основным критерием реакции базофилов (всего сосчитывается 40 клеток) являются изменения в расположении, окраске и подвижности гранул («пляска» гранул). Они скапливаются в краевых зонах цитоплазмы. Интенсивность окраски гранул уменьшается. Сами базофилы нередко изменяют форму, становясь грушевидными или вытянутыми, выбрасывают псевдоподии. В цитоплазме клеток обнаруживаются вакуоли. Ядро базофилов часто приобретает

вид пустого шара. Реакция учитывается как положительная лишь в том случае, если число измененных базофилов в опыте превышает число их в контроле на 10% и более. Условно выделяют четыре степени дегрануляции: слабую — превышение числа измененных клеток по сравнению с контролем на 10%, умеренную — на 15%, выраженную — на 20%, резко выраженную — превышение контроля на 25% и более. Во всех вариантах подразумевается превышение над тем из двух контролей, в котором была зафиксирована максимальная неспецифическая реакция клеток.

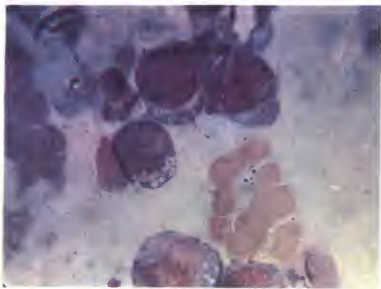
До последнего времени непрямой базофильный тест наиболее часто применялся для характеристики лекарственной аллергии (см. главу 14) и аллергии к пыльце растений. По наблюдениям А. А. Польнера (1968), у больных, сенсибилизированных пыльцой луговых трав, количество положительных реакций на аллерген тимopheевки луговой достигло 68% и на аллерген ежи сборной 37%. Значительно чаще (84,7%) положительные пробы встречались у детей (С. Х. Хутуева, 1970). Не совсем ясным остается вопрос о связи реакции базофилов на аллерген с клиническим течением заболевания. Т. И. Серова (1973), как и А. А. Польнер (1971), не нашли параллелизма между результатами специфической гипосенсибилизирующей терапии и динамикой теста. Этот факт дает основание считать, что и другие виды антител могут влиять на степень чувствительности базофилов к аллергенам.

## Г л а в а 6

### РЕАКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЛИЗА

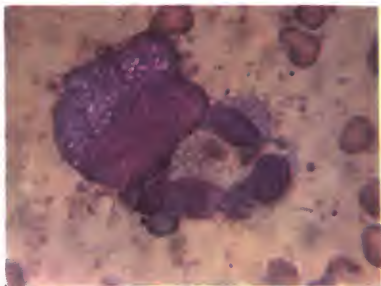
---

Методика лейколиза, предложенная Favouг в 1947 г. и использованная затем в экспериментальных и клинических исследованиях, предусматривала выделение лейкоцитов из гепаринизированной крови (10—15 мл). Favouг считает, что данный тест связан с первичным повреждением лимфоцитов, остальные лейкоциты повреждаются вторично. Отделение лейкоцитов происходило в условиях наложения крови на стерильный раствор альбумина (35% бычьего



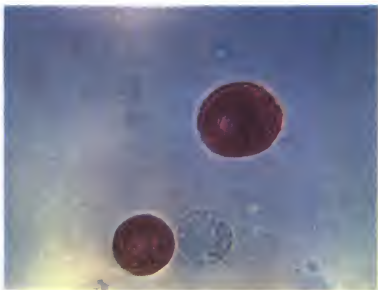
А

Рис. 15. Феномен трансформации лимфоцитов.  
А — бластные клетки средних размеров.



Б

Рис. 15. Феномен трансформации лимфоцитов.  
Б — большая бластная клетка.

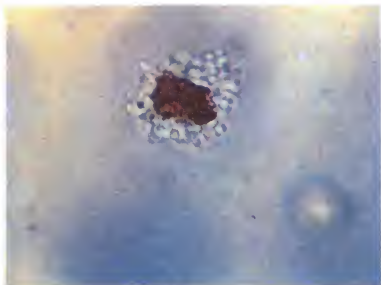


А



Б

Рис. 17. Реакция непрямо́й дегрануля́ции тучных клеток крысы.  
 А — нормальные тучные клетки; Б, В — дегранулированные тучные клетки.



В

**Рис. 17. Реакция непрямо́й дегрануля́ции тучных клеток крысы.**  
**Б, В — дегранулированные тучные клетки.**



альбумина в изотоническом растворе) при последующем центрифугировании в течение 5—15 мин при 600—1000 об/мин. Слой лейкоцитов содержал 50—80% лимфоцитов и 20—40% гранулоцитов. Для отмывания лейкоцитов осадок дважды ресуспендировали в изотоническом солевом растворе, содержавшем 10% нормальной человеческой сыворотки, 200 мг% глюкозы и 1 мг гепарина на 1 мл. Заключительное ресуспендирование элементов производилось в цельной свежей сыворотке.

При постановке пробы на цитоллиз к 0,2 мл суспензии лейкоцитов (7000—15 000 клеток в 1 мл<sup>3</sup>) добавляли 0,2 мл приготовленного на цельной сыворотке аллергена (туберкулин в концентрации 25 мкг/мл). Одновременно в аналогичных условиях готовили контрольный образец без аллергена. Смесь инкубировали при 37° до 90 мин, после чего (в счетной камере) в каждом из образцов производили подсчет лейкоцитов в 1 мм<sup>3</sup>. Возможная ошибка метода в подсчете клеток достигала 5—10%. Для оценки реакции авторы рекомендовали сосчитывать 1000 клеток. По материалам Favoug, число лейкоцитов под влиянием аллергена уменьшалось на 20—30%. В ряде проверочных работ разницы между опытом и контролем была несколько меньше. Некоторые исследователи, пытаясь увеличить разрыв между опытом и контролем, пошли по пути удлинения сроков инкубации лейкоцитов (4 ч и даже 54 ч). Однако такого рода модификации не привели к желаемым результатам.

Интерес к туберкулинолейколизу заметно снизился после того, как рядом авторов были отмечены несущественные различия в растворении лейкоцитов крови у здоровых и больных туберкулезом людей (Wiesener, Schulze, 1957, и др.). Н. М. Кулик (1964) предпринял исследование, в котором реакция лейколиза ставилась в промытом цитратом натрия капилляре Панченкова. Набранную до метки «Р» кровь смешивали затем на часовом стекле с каплей старого туберкулина Коха, вновь набирали в капилляр и инкубировали 2 ч при 37°. Затем готовили мазки, окрашивали по Романовскому—Гимзе и определяли процент лизировавшихся лейкоцитов по сравнению с контролем. При неактивной фазе туберкулезного процесса лизис колебался от 5 до 20%, при активной фазе — от 8 до 53%. Зависимости от формы процесса и степени распада в легких обнаружено не было. Максимальная величина лейколиза в группе здоровых людей составила 11%. В то же время при обследовании 4 человек с заболеваниями легких нету-

беркулезной этиологии у двух интенсивность лизиса клеток соответствовала 15 и 26%. В отличие от Favoug Н. М. Кулик обнаружил в основном лизис нейтрофилов.

Некоторые авторы сделали попытки использовать феномен лейколиза для регистрации аллергических реакций к пыльце растений и домашней пыли, развивающихся, как известно, по немедленному типу. Так, Pettit и сотр. (1961), получая кровь от сенсibilизированных лиц, предварительно определяли число лейкоцитов в  $1 \text{ мм}^3$ . Пробу на лейколиз ставили в пробирках. В каждую опытную пробирку добавляли 0,05 мл физиологического раствора, а затем 0,05 мл раствора аллергена, в контрольные пробирки — 0,1 мл физиологического раствора. Далее в каждую пробу вносили 0,9 мл цельной гепаринизированной крови. Пробирки закрывали и содержимое их перемешивали. В течение 80 мин пробы инкубировали на водяной бане при  $37^\circ$ . После перемешивания отстоявшихся фракций повторно подсчитывали лейкоциты. Отмечая повышенный лизис лейкоцитов у групп больных, сенсibilизированных к аллергенам тимофеевки и домашней пыли, Pettit с сотр. (1961) указывают вместе с тем на значительную вариабельность результатов, которая не поддается каким-либо объяснениям.

Модифицированную технику выделения лейкоцитов для реакции лейколиза применили И. И. Федоров с сотр. (1971). Как и Favoug, они оценивали лизис лейкоцитов не в цельной крови, а в лейкоконцентрате. Получение лейкоцитов было осуществлено ими в небольшом объеме крови при помощи спиральной центрифуги СЦ-1. Техника выделения лейкоцитов имела ряд особенностей. Перед проколом кожи пипетки и пробирки обрабатывали гепарином. Перенесенную в пробирку кровь (0,4 мл) тщательно пипетировали и насасывали в пластиковый капилляр, конец которого завязывали перед этим неплотным узлом. Узел затягивали и капилляр помещали в желобок СЦ-1 длиной 442 мм. После центрифугирования (10 мин) в капилляре образовывалось два основных слоя: эритроцитный (около 15 мм) и плазменный (около 5 мм) со взвешенными в нем лейкоцитами. После обозначения границ слоев рассекали капилляр сначала по верхнему плазменному слою (закрывая отверстие пастеровской пипеткой), а затем по нижнему, эритроцитному слою. Плазму с лейкоцитами выдували в центрифужную пробирку и после подсчета клеток в камере Горяева продолжали исследование.

Говоря о механизме специфического лейколиза, Favour полагал, что этот эффект обусловлен воздействием аллергена на лимфоциты сенсibilизированного организма. При этом освобождается «фактор плазмы» (отличный от обычных антител), который и разрушает клетки других типов. Вместе с тем освобождение «фактора плазмы» определенным образом оказалось связанным и со свойствами самой плазмы: перенос сенсibilизированных лейкоцитов в плазму нормального донора замедлял лейколиз.

## Г л а в а 7

### РЕАКЦИЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ (БТЛ)

---

Морфологические изменения в лимфоцитах, полученных от больных туберкулезом легких, при длительном их инкубировании *in vitro* в смеси с микобактериями туберкулеза обратили на себя внимание исследователей в середине 20-х годов (А. А. Максимов, 1924; А. Д. Тимофеевский, С. В. Беневоленская, 1925). Повреждающее действие туберкулина на культуру лейкоцитов зараженного туберкулезом животного было показано Rich и Lewis (1928).

В 1959 г. Hungerford с сотр. и в 1960 г. Novell опубликовали данные о своеобразной трансформации части малых лимфоцитов при добавлении к взвеси клеток в культуральной жидкости фитогемагглютинаина — ФГА (экстракта из бобов *Phaseolus vulgaris*). Трансформация выражалась в появлении крупных незрелых клеток, в которых интенсивно синтезировалась ДНК. Клетки отличались большими ядрами и легко обнаруживаемыми ядрышками и пиронинофильией цитоплазмы.

Аналогичный эффект при использовании в качестве стимулятора туберкулина наблюдали Reagmain с сотр. (1963).

Интерес к феномену возрастал по мере накопления данных об аналогичном эффекте при инкубации лимфоцитов с другими аллергенами и биологическими субстратами. Заметим, что механизм воздействия на клетки ФГА не может считаться выясненным. Существует предположение,

что этот экстракт продлевает *in vitro* продолжительность жизни малых лимфоцитов, а это в свою очередь является условием для пролиферации лимфоидных клеток в культуральной среде. Среди выявленных в настоящее время специфических митогенов наиболее многочисленными являются лекарственные средства: пенициллин, стрептомицин, неомицин, рибофлавин, ацетилсалициловая кислота и др. Из медицинских биологических препаратов, кроме очищенного туберкулина, должны быть названы столбнячный анатоксин и антиген вируса кори. Митогенными свойствами обладают также продукты жизнедеятельности микроорганизмов (стрептолизин S, стафилококковый альфа-токсин) и вырабатываемые макроорганизмом антитела (например, антилейкоцитарные антитела).

Значительный интерес представляет и такое направление практического применения трансформации лимфоцитов, как установление возможной трансплантационной совместимости тканей различных индивидуумов. При совместном культивировании лейкоцитов крови различных людей (микст-культуры) интенсивность их трансформации рассматривается как индикатор совместимости. Некоторые авторы указывают, что за внешним морфологическим сходством ответной реакции лимфоцитов на специфические и неспецифические агенты можно увидеть определенные функциональные различия. В частности, в исследованиях, где для бласттрансформации иммунных лимфоцитов использовался эритроцитарный антиген, после ряда делений возникали плазматические клетки, продуцирующие специфические антитела.

В. В. Манько и соавт. (1972) более широко освещают эту сторону вопроса. По их мнению, БТЛ относится к числу стереотипных реакций лимфоидной ткани в ответ на различные стимуляторы и первая фаза реакции в любом случае характеризуется неспецифическими чертами — превращением лимфоцита в незрелую митотически активную клетку (лимфобласт). В условиях, когда стимулятор имеет неспецифическую природу (ФГА), бласты при достаточно длительной инкубации погибают или вновь переходят в форму малого лимфоцита. Авторы соглашаются с тем, что специфическая антигенная стимуляция обуславливает дифференцировку бластов в клетки плазматического ряда. Наконец, при рассмотрении судьбы микст-культур, где предварительная сенсibilизация доноров отсутствует, речь может идти о первичной гомотрансплантационной реакции.

Такая гипотеза представляет несомненный интерес, однако остается невыясненным ряд вопросов. Так, известно, что неспецифические стимуляторы вызывают интенсивную бластную реакцию в наиболее короткие интервалы времени (3-и сутки), в то время как для специфических биологических препаратов и микст-культур оптимальное время для учета теста падает на 4—6-й день. Если ФГА позволяет в большинстве случаев получить до 70—90% бластов, то специфические стимуляторы, даже при использовании лимфоцитов, полученных от предварительно иммунизированных людей, вызывают феномен трансформации лишь в 10—50%.

Причины несовпадений бласттрансформирующей активности лимфоцитов крови на неспецифические и специфические стимуляторы требуют специального изучения. В этой связи вызывает интерес сообщение Hirschhorn (1968) о возможности устранения бластной «анергии». В нескольких случаях, когда у больных феномен трансформации лимфоцитов на специфический стимулятор не возникал, было проведено удаление аутоплазмы, и после отмывания клеток в систему вносилась сыворотка другого лица. В новых гуморальных условиях «анергия» лимфоцитов исчезала.

С другой стороны, мы могли убедиться в том, что активность даже такого сильного неспецифического стимулятора, каким является ФГА, может существенно зависеть от особенностей клинического течения хронического инфекционного процесса (В. А. Фрадкин и соавт., 1971). После установления и применения дозы ФГА-Р фирмы Difco, обладающей невысокой активностью (5 мкг/мл), в группе больных с выраженным обострением туберкулезного процесса в легких средняя величина трансформации лимфоцитов составила 41,1%, при затихающей вспышке — 23,6%, а у практически здоровых неинфицированных лиц (с отрицательными внутрикожными пробами на туберкулин) — 25,8%. При увеличении дозы ФГА в 4 раза (20 мкг/мл) частота нахождения бластов в первой группе достигла 77,8%, во второй — 48,1%.

Оценка трансформирующего эффекта должна быть рассмотрена и под углом зрения воздействия на этот процесс других категорий лейкоцитов крови, тем более что в одних работах используется полная взвесь лейкоцитов крови, а в других — выделенная фракция малых лимфоцитов. В последние годы был опубликован ряд сообщений

(Schechter e. a., 1970, и др.) о заметном усилении БТЛ при содержании в культуральной среде, кроме лимфоцитов, и гранулоцитов. В этой связи в 1971 г. сотрудники нашей лаборатории рассмотрели два вопроса: 1) появляются ли в аутоплазме сенсibilизированного больного такие качественные изменения (в результате непродолжительной 3-часовой инкубации цельной крови со специфическим аллергеном), которые могут оказать воздействие на интенсивность трансформации аутологичных лимфоцитов, 2) в какой мере инкубация цельной крови сенсibilизированного донора в присутствии специфического аллергена влияет на последующую бластную реакцию самих лимфоцитов, выделенных из такой крови.

Изучение реакции под этим углом зрения показало, что лейкоциты больных туберкулезом легких, выделенные по истечении 3-часовой инкубации цельной крови с туберкулином, оказывают потенцирующее влияние на бластную реакцию аутологичных лимфоцитов. Возрастание процента проинкубированных с туберкулином лейкоцитов крови в культуральной среде при постоянном числе клеток в  $1 \text{ мм}^3$  приводило к более интенсивной бластной реакции, несмотря на то что абсолютное количество малых лимфоцитов в этих случаях оказывалось меньшим из-за существенной примеси гранулоцитов. В противоположность этому освобожденная от лейкоцитов аутоплазма, полученная после кратковременной инкубации цельной крови, заметного влияния на выраженность феномена не оказывала.

Расшифровка механизма усиления бласттрансформирующей активности мононуклеаров крови в присутствии полиморфноядерных лейкоцитов потребует, разумеется, дополнительных исследований. В этом плане, с нашей точки зрения, заслуживает внимания проблема реутилизации отмирающих лимфоцитов. Как известно, реутилизация клеточных элементов является одной из основных функций макро- и микрофагов. Опубликованные в литературе материалы свидетельствуют о том, что после введения в организм меченых лимфоцитов (тимоцитов) уже спустя несколько часов радиоактивная метка обнаруживалась в ретикулярных клетках и гранулоцитах. Глубокое ферментативное расщепление фагоцитами поглощенных субстратов позволяет ставить вопрос о последующем поступлении в кровь ряда продуктов (например, нуклеиновых кислот), обладающих, по-видимому, митогенной активностью. Кроме того, в условиях культивирования клеток крови *in vitro*

нейтрофилы достаточно быстро отмирают и комплекс содержащихся в них биологически активных веществ, подвергшихся так называемой аутоцеллюлярной ферментной обработке, поступает в культуральную питательную среду.

С этих позиций можно рассмотреть и результаты, полученные Kasakura (1972), который культивировал лейкоциты здоровых людей в среде № 199 с 20% аутологичной плазмой без добавления митогенов. Взятая спустя 5 сут надосадочная жидкость или преципитат, полученный после ее ультрацентрифугирования, оказывали выраженный трансформирующий эффект на свежие культуры аутологичных или аллогенных лимфоцитов. С другой стороны, были получены данные об изменении степени митогенного эффекта под влиянием ФГА за счет включения в среду мембран эритроцитов (Iohson и соавт., 1972). Соотношение эритроцитов к лейкоцитам 100 : 1 оказалось для этой цели оптимальным. Выше уже отмечалось влияние клеток стромы на специфические реакции лимфоидных элементов (А. Я. Фриденштейн, 1973). Все это указывает на перспективность дальнейших исследований по выяснению роли «некомпетентных» клеточных структур в реакциях специфического иммунитета.

К числу интересных, но достаточно трудных для решения задач относится установление условий, при которых лимфоциты крови претерпевают трансформацию в организме человека. Такого рода наблюдения мы находим в работе Ногие Акио (1972). Среди клеточных элементов, полученных из хронических воспалительных очагов, автор обнаруживал формы, которые визуальнo не отличались от бластоподобных элементов, возникавших из малых лимфоцитов крови *in vitro* под воздействием ФГА. По данным литературы, морфологически видимой бластной реакции лимфоцитов предшествует комплекс сложных внутриклеточных преобразований: усиливается ацетилирование гистонов, и в первую очередь богатых аргинином, изменяется характер окраски гистонов; уменьшается устойчивость ядра клетки к тепловому воздействию; интенсифицируется синтез ДНК и РНК. Материалы Waithe и Hirshhorn (1971) показали, что добавление ФГА в культуральную среду в дозе 0,5 мкг/мл уже спустя 16 ч ускоряет синтез белка в лимфоцитах в 3 раза, а спустя 20 ч — более чем в 4 раза.

Постановка реакции трансформации лимфоцитов сопряжена с длительным культивированием клеток и требует

в этой связи стерильных условий. В пробирку, смоченную гепарином (20—25 ед на 1 мл крови), вносят 10—15 мл венозной крови. Для осаждения эритроцитов чаще всего применяют 10% желатину (1 мл на 10 мл крови). Содержимое пробирки осторожно перемешивают и кровь инкубируют при 37° в течение 50—60 мин, отсасывая затем конусообразный слой плазмы, содержащий значительное количество лейкоцитов. С помощью счетной камеры устанавливают число клеток в 1 мм<sup>3</sup>. После центрифугирования (10 мин при 1000 об/мин) плазму отбрасывают, а лейкоциты дважды отмывают в подогретой до комнатной температуры среде № 199.

В тех случаях, когда исследования проводятся с малыми лимфоцитами без существенной примеси гранулоцитов, взвесь лейкоцитов фильтруют. Наиболее доступным и достаточно надежным методом выделения лимфоцитов является фильтрация элементов через колонку, заполненную слоем хлопковой ваты при температуре 37°. Слой должен укладываться волнисто и рыхло. Простейшей формой колонки может явиться средних размеров ампула или специальная пробирка, конец которой вытянут в виде воронки. Для фильтрования лейкоцитов, собранных из 10—15 мл крови, высота ватного фильтра должна быть 3—3,5 см при диаметре стеклянного цилиндра 1,5 см. Вслед за прохождением через фильтр первичной взвеси лейкоцитов производят дополнительное промывание системы средой № 199 или средой Игла в объеме, превышающем объем плазмы в 2—3 раза. Когда объем первичной клеточной взвеси менее 2,5 мл, рекомендуется до начала фильтрации добавить к взвеси клеток среду № 199 до суммарного объема 3,5—4 мл, что обеспечивает полное смачивание ватного фильтра. Как показывает микроскопия клеточной взвеси, профильтрованные элементы на 90—95% состоят из мононуклеаров.

Более сложным методом выделения лимфоцитов является способ Rabinowitz (1964), основанный на несовпадающих условиях прохождения различных по величине и функциональным свойствам лейкоцитов через специально подготовленные стеклянные колонки, заполненные чередующимися слоями стеклянных бус и стекловолокна. По наблюдениям Hinz и Chickosky (1972), при использовании колонки с нейлоновой ватой число стимулированных элементов было на 25% меньше, чем при их параллельном получении путем оседания в растворе желатины. В отдель-



ных исследованиях (Pentycross, 1968) мононуклеары выделяют путем добавления к 10 мл гепаринизированной крови (других антикоагулянтов не использовать!) 100 мг частиц карбонильного железа (диаметр частицы 3 мкм) с последующим ее медленным вращением в течение 30 мин при 37°. Частицы железа накапливались в полинуклеарах. Последние затем отбрасывали в достаточно сильном постоянном магнитном поле. Paty и Hughes (1972) для получения очищенной суспензии лимфоцитов использовали смесь дефибринированной крови с карбонильным железом и метил-целлюлозой.

Численность выделенных лимфоцитов определяют в счетной камере Горяева. Затем клетки в течение 10 мин центрифугируют (лучше в конических пробирках) при 1000 об/мин или 5 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отбрасывают. Дальнейшие этапы работы как с цельной взвесью лейкоцитов крови, так и с выделенными в результате фильтрования лимфоцитами совпадают: к отцентрифугированным клеткам добавляют нагретую до комнатной температуры среду № 199, которую непосредственно перед исследованием разводят донорской сывороткой АВ группы крови (70% среды и 30% сыворотки). Добавление сыворотки обеспечивает повышение питательных свойств среды и тем самым создает оптимальные условия для репродуцирующей активности лимфоцитов. Для разведения среды № 199 можно использовать и аутоплазму обследуемого лица, которую собирают в процессе фильтрования взвеси лейкоцитов. В связи с тем что при использовании аутологичной плазмы, по данным некоторых авторов, достигается более высокий уровень трансформации клеток, чем при использовании гомологичной сыворотки крови, не следует в ходе динамических наблюдений изменять состав культуральной среды. При использовании плазмы инфекционных больных (Ling, 1971) в ряде случаев имеет место, наоборот, снижение степени бласттрансформации. Менее пригодна для этих целей сыворотка коровьих эмбрионов или телят, так как она оказывает на клетки фоновый стимулирующий эффект. Чтобы предотвратить размножение в среде случайно попавших микроорганизмов, в нее включают пенициллин и стрептомицин (из расчета 100 ЕД каждого из антибиотиков на 1 мл среды). Разведение антибиотиков осуществляется в среде № 199.

По данным многих авторов, концентрация культивируемых клеток  $1 \cdot 10^6$  в 1 мл является оптимальной. При

такой численности клеток облегчается сохранение заданных значений рН и обеспечивается необходимое качество среды. С другой стороны, интенсивная митогенетическая активность моноклеаров наблюдается в случаях, когда количество лимфоцитов оказывается не менее 250 000. Подготовленную клеточную взвесь после добавления нужных концентраций изучаемых митогенов разливают во флаконы. В процессе исследований нужно стремиться к созданию в них постоянной высоты столба питательной среды, так как от этого фактора зависит режим насыщения среды кислородом. Достигается это стандартностью флаконов. Так как пониженное парциальное давление кислорода положительно влияет на феномен трансформации лимфоцитов (концентрация кислорода от 20 % и выше задерживает реакцию), целесообразно перед закрытием флаконов резиновыми пробками обеспечивать присутствие в них воздушной смеси, содержащей 5% углекислого газа. Для сохранения высокой питательности среды в некоторых лабораториях уже в процессе культивирования лейкоцитов во флаконы добавляют глютамин (100 мкг/мл).

Культивирование лимфоцитов происходит при 37°. Срок культивирования может колебаться в зависимости от характеристики специфического стимулятора (аллергена) от 4 до 7 сут. В течение этого периода содержимое флаконов не должно подвергаться каким-либо встряхиваниям. По окончании инкубации клетки переводятся во взвешенное состояние взбалтыванием и вместе с культуральной жидкостью переносятся в пробирки для центрифугирования (10 мин при 2000 об/мин). Поскольку при изготовлении мазков их лучшее качество достигается в присутствии сыворотки, жидкую фазу отбрасывают, добавляют цельную сыворотку и повторно центрифугируют. За исключением одной капли, удаляют весь супернатант. Пипетируют тонкой пастеровской пипеткой клеточный осадок, переносят небольшой объем элементов на одно или два предметных стекла и готовят мазки. Для оценки реакции методом подсчета бластов в световом микроскопе препараты подсушивают на воздухе, 5 мин фиксируют в метаноле и окрашивают смесью азура и эозина. Каждый из этих красителей готовят раздельно (1 г на 1 л прокипяченной дистиллированной воды) и после фильтрования хранят при комнатной температуре. Для приготовления рабочей смеси 10 мл азура смешивают с 8 мл эозина. После фиксации мазки заливают смесью на 15—20 мин, промывают водой и после

высушивания микрофотографируют под иммерсией. В каждом мазке сосчитывают не менее 1000 клеток.

В процессе подсчета учитывают две категории клеток: бласты и лимфоциты. Бласты могут достигать 25—30 мкм в поперечнике и отличаются разнообразной морфологией. Среди них достаточно часто встречаются клетки с округлыми или неровными краями и хорошо развитой базофильной цитоплазмой, площадь и яркость которой варьируют. Зоны цитоплазмы (в них встречаются светлые вакуоли) обычно со всех сторон окружают крупное ядро. В ядре на фоне сетчатой структуры хроматина просматривается одно или несколько ядрышек. Одновременно могут встречаться и митотические клетки. При микроскопии препаратов возникает необходимость отдифференцировать от бластов так называемые переходные формы. Они отличаются меньшей величиной, менее обширной зоной цитоплазмы, более интенсивным прокрашиванием ядра и меньшими по размерам ядрышками (рис. 15, см. на цветн. вкл. между стр. 96—97).

Поскольку во многих случаях эффект трансформации лимфоцитов у больных не обнаруживается или выявляется в минимальной степени, возникает необходимость контроля, который позволил бы утверждать, что все этапы исследования были выполнены правильно. С этой целью наиболее уместно использовать мощный неспецифический стимулятор — ФГА. При концентрации клеток  $1 \cdot 10^6$  в  $1 \text{ см}^3$  ФГА вызывает трансформацию в 40—90% сосчитанных элементов. Следует иметь в виду, что ФГА, изготовленный разными фирмами, и даже разные серии препарата одной фирмы могут иметь неоднозначную активность. Параллельно с ФГА ставят и второй контроль с нестимулированными клетками. Говоря о необходимости выполнения контрольных исследований, следует принять во внимание и тот факт, что даже у одного и того же лица интенсивность бластообразования может заметно варьировать в пределах нескольких дней. Развертывая наблюдения, связанные с постановкой БТЛ, аллерголог сталкивается еще с одной задачей: число митогенов, для которых точно определены их оптимальные дозировки на 1 мл среды, сравнительно невелико. При определении «рабочих» доз не применявшихся ранее аллергенов возникает необходимость в таком контроле, как оценка токсичности препарата. Он предусматривает предварительное изучение бластогенного эффекта дозы при использовании лимфоцитов крови лиц, у которых проявления аллергии не были обнаружены.

При регистрации интенсивности БТМ многие авторы пришли к заключению, что выражение конечного результата в процентах не является достаточно точным способом оценки реакции, так как в течение достаточно продолжительной инкубации часть малых лимфоцитов погибает.

Чтобы исключить влияние этого фактора, Coulson и Chalmers (1967) предложили использовать формулу

$$\frac{1000 (N_0 - N_k)}{N},$$

где 1000 — число сосчитанных клеточных элементов;  $N_0$  — число обнаруженных бластов в опытном препарате в период учета реакции;  $N_k$  — аналогичное число в контрольном препарате;  $N$  — количество малых лимфоцитов в  $1 \text{ мм}^3$  взвеси перед помещением флаконов с культуральной средой в термостат.

Для оценки бластной реакции лимфоцитов во многих лабораториях успешно применяется метод автордиографии. Он основан на включении радиоактивных меток в трансформирующиеся элементы. Об активности трансформированных культур по сравнению с контрольными судят по включению тимидина- $\text{H}^3$  в ДНК клеток, по включению уридина- $\text{H}^3$  в РНК клеток или по включению меченой аминокислоты, например глицина- $\text{H}^3$  или глицина- $\text{C}^{14}$  в белки. Маркеры вносят в культуральную среду за 18—24 ч до завершения инкубационного цикла. Приготовленные обычным путем и зафиксированные препараты методом погружения покрывают жидкой эмульсией типа «М». После застывания эмульсии их экспонируют в светонепроницаемом контейнере 7—10 дней при  $+4^\circ$ . После проявления автордиограмм обычным путем окрашивают препараты и подсчитывают под микроскопом число меченых клеток. Существует и методика тотального определения меченых предшественников, поступивших в клеточные элементы, подсчет с помощью сцинтилляционных счетчиков. Поскольку указанные методики связаны со специальными реактивами, а сцинтилляционный подсчет требует и дополнительной аппаратуры, учитывая, что при этом удлиняется время получения результатов, клинические лаборатории обычно используют морфологический метод учета реакции. По заключениям ряда исследователей, морфологический и автордиографический методы учета реакции дают совпадающие результаты (Capon, 1967, и др.). Более подробно метод автордиографии изложен в монографии Ling (1968)

«Стимуляция лимфоцитов», изданной на русском языке в 1971 г.

Выше уже отмечалось, что интерес к БТЛ значительно возрос после 1963 г. в связи с работой Reagmain с сотр. В результате за прошедшие 12 лет в этом направлении было опубликовано значительное число работ, однако в большинстве из них данный феномен изучался не с позиций прикладной аллергологии, а в целях расшифровки механизма формирования клеточного иммунитета и активации лимфоцитов или оценки изоантигенных различий тканей. Интенсивно изучались и изучаются вопросы, связанные с уточнением патогенеза заболеваний, при которых отмечаются нарушения реакций со стороны элементов моноклеарного ряда.

Исходя из задач и возможностей настоящей книги, мы рассмотрим только те положения, которые имеют непосредственное отношение к оценке проявлений специфической сенсибилизации у больных. Большинство работ такого профиля оказалось связанным с применением туберкулина, стрептококковых и стафилококковых антигенов и лекарственных препаратов. Отдельные наблюдения касаются растительной пыли.

## Бласттрансформация с туберкулином

Для исследований применяют сухой очищенный туберкулин (РРД). В работах различных авторов оптимальная по активности концентрация туберкулина колеблется в пределах от 1 до 50 мкг на 1 мл среды. Применение более высоких доз аллергена снижало трансформирующий эффект. Следует иметь в виду, что активность разных серий туберкулина может колебаться в пределах  $\pm 20\%$  от основного национального или международного стандарта.

Диагностическое значение реакции в клинике туберкулеза или в первые месяцы после туберкулинового «виража» все еще служит предметом дискуссии (Л. С. Когосова, Е. Ф. Чернушенко, 1970). В значительной мере это объясняется несовпадением в трактовке клинических фаз туберкулезного процесса.

Дополнительного изучения требует также в этой связи точка зрения о неоднородности популяций малых лимфоцитов (Ling, 1968). При сравнении характера БТЛ у инфицированных, но практически здоровых людей и больных

туберкулезом ряд авторов обнаружили более интенсивную реакцию у первых. Таким образом, корреляция между уровнем БТЛ и выраженностью реакций кожи на туберкулин чаще всего отсутствовала. Отсутствие корреляции было зафиксировано и у лиц, вакцинированных с целью профилактики туберкулеза вакциной БЦЖ.

Достаточно обширное использование феномена БТЛ в клинике туберкулеза мы находим в работе В. Я. Гергерта (1970). Обследовав более 140 больных со специфическим и неспецифическим поражением легких, он указал на следующие закономерности: 1) наименьшая способность малых лимфоцитов крови к трансформации характерна для фазы инфильтративной вспышки заболевания. При этом наименьшая из использованных доз туберкулина (6 мкг/мл) вызвала наиболее выраженную реакцию; 2) изменению динамики туберкулезного процесса в сторону его инволюции сопутствовало усиление феномена БТЛ. В. Я. Гергерт поддерживает мнение о том, что пролиферативная реакция клеток на раздражитель находится в обратной зависимости от активности инфекционного процесса и достаточно отчетливо коррелирует с напряженностью противотуберкулезного иммунитета.

### Бласттрансформация с бактериальными аллергенами и продуктами жизнедеятельности микроорганизмов

Значительная часть наблюдений в этой области относится к изучению сенсибилизации организма к стрептококку. В качестве митогенов ряд авторов применяли стрептолизин-О или стрептокиназу. При острых стадиях суставного ревматизма, гломерулонефрита БТЛ была низкой независимо от титра специфических антител. При использовании корпускулярных стрептококковых антигенов параллелизм между уровнем трансформации клеток, с одной стороны, и титрами антистрептолизина, антистрептокиназы и кожными пробами на специфический аллерген — с другой, также отсутствовал.

В реакции лимфоцитов на стафилококковый антиген был использован мукопептид, выделенный из оболочки золотистого стафилококка (Fumarola, 1969). И в этом случае проявилась закономерность, о которой говорилось

При изложении данных, полученных при использовании туберкулина. Минимальная доза — 0,1 мкг/мл — вызывала трансформацию лимфоцитов у обследованных лиц в 6,6%, доза 0,5 мкг/мл — в 14%, доза 1 мкг/мл — в 12%. Автор высказывает мнение, что повышенные концентрации стимулятора дают цитотоксический эффект.

Virtue с сотр. (1971) для оценки БТЛ у больных бронхиальной астмой использовали антигенную смесь из 5 микроорганизмов. В нее входили  $\beta$ -гемолитический стрептококк, золотистый стафилококк, палочка инфлюэнцы, дифтерийный и диплококк пневмонии. Максимальное включение тимидина-Н<sup>3</sup> наблюдалось на 3—4-е сут, причем в группе больных бронхиальной астмой и в группе здоровых людей средние величины БТЛ практически совпали. Таким образом, суммация антигенных стимулов не сопровождалась ожидавшимся усиленным ответом со стороны лимфоцитов.

### Бласттрансформация с аллергенами из растительной пыльцы

Число исследований, связанных с применением растительной пыльцы в качестве стимулятора трансформации мононуклеаров, невелико. В 1966 г. Zeitz с сотр. сообщили, что при использовании пыльцы тимфеовки показатели указанной реакции у лиц, чувствительных к аллергену, составили в среднем 24%. Курс специфической гипосенсибилизирующей терапии не привел к существенному снижению этого уровня. В контрольной группе показатель БТЛ был равен 2,2%. По данным Girard с сотр. (1967), каждый растительный аллерген характеризуется своей оптимальной концентрацией, вызывающей наибольшую БТЛ. Увеличение доз аллергенов выше оптимального уровня не вело к усилению реакции лимфоцитов. При оценке аллергии к пыльце амброзии (Richter, Naspitz, 1968) наилучшие диагностические результаты получались при использовании 100 мкг препарата на 4 мл среды (концентрация клеток  $1 \cdot 10^6$ ) и при учете реакции на 7-й день.

В своей совокупности приведенные материалы не оставляют сомнений в том, что реакция бласттрансформации лимфоцитов относится к числу специфических иммунологически значимых феноменов. Следует думать, что значение данного метода в оценке природы и выраженности сенсибилизации организма будет возрастать по мере

установления оптимальных митогенных концентраций возможно большей номенклатуры аллергенов. Далее, должны быть разработаны методы, позволяющие охарактеризовать степень однородности циркулирующих в крови больного лимфоцитов. Это, по-видимому, поможет расшифровать природу отклонений в показателях реакции внутри групп больных с совпадающими клиническими проявлениями патологического процесса.

Наконец, должен быть решен вопрос, в какой мере данный тест способен отразить глубину аллергической перестройки организма. Снижение показателей БТЛ в период обострения хронических инфекционных заболеваний и более высокие показатели у инфицированных, но практически здоровых людей дают основание полагать, что основное диагностическое значение реакции окажется связанным с характеристикой клеточного иммунитета.

## Г л а в а 8

### РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ МИГРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

---

Как и исследование бласттрансформации лимфоцитов крови, начало изучения феномена задержки миграции мононуклеаров под воздействием специфического антигена связано с исследованиями А. А. Максимова (1924), А. Д. Тимофеевского и С. В. Беневоленской (1925), Rich и Lewis (1928). После серии работ, в которых в качестве антигена использовали туберкулин, совпадающие результаты были зарегистрированы со специфическими антигенами при проявлениях аллергии к гемолитическому стрептококку и бруцеллам.

В 1947 г. Nantz и Blatt опубликовали описание типового теста культуры лейкоцитов для изучения бактериальной аллергии. Двумя годами позже методика была упрощена и унифицирована (Blatt и соавт., 1949). Авторы отмечали, что она может использоваться и для оценки эффекта десенсибилизирующей терапии. Основные этапы теста состояли в следующем: из вены больного брали около 9 мл крови. В конических пробирках кровь смешивали с цитратом



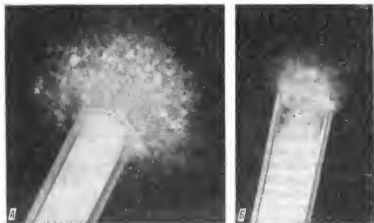
натрия и после отстаиваний и удалений плазмы из неё получали пленку коагулировавших (под влиянием промывания раствором Рингера) лейкоцитов. Лейкоциты вновь отмывали и в смеси с раствором Рингера инкубировали (при периодическом встряхивании) в течение часа при 37°. Далее на предметные стекла ставили кольца из органического стекла, в которые вносили суспензию лейкоцитов, бактериальный фильтрат или аллерген (туберкулин) и бычий тромбин. В контрольные кольца вместо аллергена добавляли глицериновый бульон. Кольца герметизировали обрезками стекла и инкубировали в течение 20 ч. Оценка результатов исследования состояла в определении морфологических изменений лейкоцитов при подсчете 100 клеток с помощью окулярной сетки и объектива  $\times 16$ .

Последующие проверочные работы показали, что определение сенсibilизации организма описанным способом не отличается точностью (Hall, Scherago, 1957).

O'Neil и Favour (1955) впервые применили для оценки миграции лейкоцитов крови человека капиллярные трубки. Сухой туберкулин в концентрации 100 мкг/мл резко снижал миграцию клеток, полученных от больных туберкулезом. Отмывание лейкоцитов не лишало их чувствительности к туберкулину. Наблюдалась задержка миграции лейкоцитов и здоровых людей, если перед добавлением туберкулина их инкубировали с сывороткой больных.

Более широкое использование теста задержки миграции лимфоцитов оказалось связанным с клиническими наблюдениями SØborg, Bendixen (1967) и др., в которых были уточнены некоторые методические приемы. В настоящее время, кроме исследований, направленных на изучение проявлений бактериальной аллергии в клинике туберкулеза, накапливаются данные, полученные при внесении в систему стрептококкового аллергена, антигена из токсоплазм, антибиотиков (пенициллин, неомицин), бластоматозных субстратов и др. Предпринимаются попытки оценить задержку миграции лимфоцитов при терапевтических заболеваниях с выраженным аутоаллергическим компонентом (хронический гепатит, язвенный колит, тиреоидит Хашимото и др.).

Большинство авторов отмечает, что выраженная задержка миграции лимфоцитов наступает лишь при достаточно высоких концентрациях аллергена. Так, по данным М. М. Авербаха и сотр. (1972), при обследовании больных туберкулезом легких в фазе инфильтративной вспышки



#### 16. Торможение миграции лимфоцитов из капилляров.

А — миграция лимфоцитов, выделенных из крови больного туберкулезом без туберкулина; В — то же в присутствии туберкулина (200 мкг сухого очищенного аллергена на 1 мл среды).

индекс задержки миграции, вызванной сухим очищенным туберкулином в дозе 200 мкг/мл среды, был равен 0,352, а при 20 мкг — 0,643, при рассасывании инфильтративных изменений — соответственно 0,775 и 0,958. Критерий достоверности Р по сравнению с контрольной группой (0,963 и 1,040) был меньше 0,02. В некоторых случаях доза 20 мкг/мл вызывала не задержку миграции лимфоцитов, а резко выраженный стимулирующий эффект (В. Я. Гергерт, 1970).

Существуют две основные модификации теста задержки миграции лимфоцитов: с использованием капиллярных трубок (рис. 16) и в агаровой среде. Для исследований требуются асептические условия, стерильные среды и лабораторная посуда. В тех случаях, когда при отсутствии аллергена (контрольная камера) движения клеток в открытый конец капилляра не происходит, следует думать о потере жизнеспособности клеток. При неудовлетворительном контроле задержка миграции лимфоцитов в опытных образцах не учитывается.

Количество крови, необходимое для однократного алергологического исследования, обычно не должно быть меньше 10 мл. Для консервации крови предпочтительнее использовать раствор гепарина концентрации 1000 ед/мл

на 10 мл крови. Повышенные концентрации гепарина оказывают на клетки крови токсическое действие. Предотвращение свертывания крови достигается путем тщательного пипетирования или многократного переворачивания пробирок при наличии стерильных жестких пробок. Rosenberg (1971) рекомендует в качестве консерванта гепарина применять бензпловый спирт (но не фенол). Единого подхода к выделению взвеси лейкоцитов не существует. В одних случаях для отделения элементов белой крови применяли 3—10% желатин или 5% раствор декстрана с молекулярным весом 250 000 (конечная концентрация 0,6%); с каждым из этих компонентов кровь инкубировали при 37° в течение часа, после чего отсасывали плазму с лейкоцитами. В других случаях хорошие результаты были получены при выделении лейкоцитов путем простого отстаивания крови в течение часа при 37°. Отказ от высокомолекулярных соединений Sjøborg (1971) обосновывает тем, что они задерживают некоторое количество эритроцитов, которые, по мнению автора, могут вести к получению нестабильных результатов. В ряде исследований, где применялась желатина, для устранения этого влияния эритроцитов плазму центрифугировали (5—8 мин при 1000 об/мин), надосадочный слой отбрасывали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл 0,35% раствора хлорида натрия и в течение 30 мин осторожно пипетировали. Этим достигался лизис эритроцитов. Затем быстро добавляли 0,6 мл 5% раствора хлорида натрия, и среда становилась изотонической. Взвесь лейкоцитов центрифугировали в указанном выше режиме и солевой раствор отбрасывали. Впрочем, некоторые авторы (Rosenberg, 1971) отмечают, что незначительное присутствие эритроцитов не влияло на результаты диагностики. При использовании метода простого отстаивания крови плазму отсасывают таким образом, чтобы небольшой ее объем оставался над слоем эритроцитов. Обычно из 10 мл крови удается получить до 4 мл плазмы, в которой большинство клеток (до 70%) являются полиморфноядерными лейкоцитами.

В тех случаях, когда применяется гипотонический раствор, осадок лейкоцитов дважды отмывают в культуральной среде (5 мин при 1000 об/мин). При простом отстаивании крови эту процедуру повторяют трижды. Для отмывания используют среду № 199 или среду Хенкса (разовый объем 5—6 мл). Учитывая токсическое влияние гепарина на лейкоциты, отмывание клеточного осадка следует начи-

нать возможно быстрее. После завершающего центрифугирования лейкоциты ресуспендируют в культуральной среде, обогащенной лошадиной сывороткой (концентрация 10%). Конечная концентрация клеток в 1 мл должна находиться в пределах  $6-7 \cdot 10^6$ .

Используемые для исследований капилляры могут иметь длину 18—20 см, внутренний диаметр 1,1—1,2 мм. Клеточную взвесь отсасывают в капилляр таким образом, чтобы она создавала столбик высотой 6,5—7 см. Со стороны пустой части капилляр запаивают и после остывания в него перемещают (при помощи встряхивания) суспензию лейкоцитов. Заполненные капилляры помещают в пробирки закрытыми концами книзу и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин или 10 мин при 500 об/мин. В этой стадии более интенсивное центрифугирование может излишне сильно уплотнить взвесь клеток, привести к ее агглютинации и обусловить непостоянство результатов диагностики. Отступя до 1 мм от границы образовавшихся слоев (в сторону плотного клеточного слоя), капилляр обрезают, следя за ровностью краев распила. При этом вместе с надосадочной жидкостью удаляется и прослойка тромбоцитов крови, которая может явиться своеобразной пробкой, мешающей миграции лейкоцитов. Перед распиливанием капилляра его стенки обрабатывают спиртом и просушивают стерильной марлей. Конец капилляра с клетками быстро помещают в камеру типа Makassess. Последние могут изготавливаться из натурального или органического стекла. После закрепления запаянного конца капилляра в ячейке (это достигается применением силиконового клея или расплавленного парафина) в камеру немедленно вносят среду № 199 с 20% содержанием сыворотки крупного рогатого скота без примеси консерванта [Bendixen и SØborg (1970), добавляли в среду 10% сыворотки]. В опытных камерах среда содержит также соответствующий аллерген. Камеры заполняют средой до краев, закрывают покровными стеклами, их края фиксируют при помощи расплавленного парафина. В каждой камере в соответствии с числом ячеек могут фиксироваться 4—6 капилляров. Герметически закрытые камеры с капиллярами помещают в термостат или на водяную баню при 37° на 24 ч.

Как показывают наблюдения, миграция лейкоцитов в камеру начинается уже спустя несколько минут. Bendixen и SØborg (1970) обращают внимание на необходимость поддержания в культурной среде точно-

го значения рН (7,3). По мнению этих авторов, при рН ниже 7,2 феномен задержки миграции лимфоцитов антигеном хотя и обнаруживается, но теряет черты специфичности.

Значения же рН выше 7,3 (это может зависеть от присутствия пузырьков воздуха в камере или от ее неполной герметизации) оказывают на мигрирующие клетки повреждающее действие.

По окончании срока инкубации камеры вскрывают и регистрируют площадь миграции мононуклеаров. Исчисление миграционной зоны производят с помощью фотоувеличителя (концы выступающих из ячеек капилляров проецируют на фотопленку) или с помощью лупы и рисовального устройства. Зону миграции обмеряют планиметром или вырезают и взвешивают. В работе М. М. Авербаха с сотр. (1972) миграцию оценивали по индексу:  $I = \frac{P^0}{P^k}$ , где  $P^0$  — средний вес вырезанных площадей миграции при воздействии туберкулина;  $P^k$  — тот же вес в контроле.

Для постановки пробы с одним аллергеном используют не менее 4—5 капилляров. Специальные наблюдения (Rosenberg, 1971) показывают, что вокруг хорошо заметной зоны миграции всегда обнаруживается ореол, состоящий в основном (до 90%) из нейтрофилов. При этом подавления миграции полиморфноядерных лейкоцитов под влиянием аллергенов не происходит.

Как уже отмечалось, для успеха исследования несомненное значение имеет жизнеспособность лейкоцитов. Одни авторы используют в этой связи выделение и отмывание клеток при низкой температуре (1—4°). С этой целью они применяют центрифуги с охлаждающим устройством и смесь воды со льдом.

Другие авторы рекомендуют выполнять все этапы работы возможно быстрее с тем, чтобы время от момента взятия крови до внесения капилляров в камеру не превышало 2½ ч. Следует указать, что перечень аллергенов, использованных для выяснения диагностических возможностей теста задержки миграции мононуклеаров, остается все еще незначительным и продолжает служить предметом интенсивного изучения. В этой стадии обнаруживаются факты, которые требуют дополнительной проверки и объяснения. Так, Zabriskie (1971) сообщил, что у ряда специфически сенсibilизированных людей зф-

факт задержки миграции при использовании очищенного туберкулина (0,02—0,05 мг/мл) отсутствовал, в то время как при использовании культуры БЦЖ, обработанной небольшой дозой ультразвука, он был отчетливым: на дозу  $1 \cdot 10^6$  микобактерий в 1 мл среды средняя величина задержки составила 26,7% ( $\pm 2,0$ ), на дозу  $2 \cdot 10^6$  — 32,4% ( $\pm 3,8$ ).

Второй модификацией обсуждаемого теста является постановка реакции в агарозном геле (Clausen, 1971, и др.). В этом случае получение крови, выделение и отмывание лейкоцитов может осуществляться по изложенной ранее схеме. С помощью стерильного шаблона из нержавеющей стали в агарозном геле пробивают отверстия диаметром 2—3 мм (4—5 на каждую чашку Петри). В работе Clausen в состав агарозного геля входила сыворотка животного (10%), стерильная дистиллированная вода (30%), концентрированная среда № 199 (10%) и антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 66 ЕД/мл). Кроме того, в расплавленную и охлажденную до 47° агарозу добавляли такое количество 10% бикарбоната натрия, чтобы после суточной инкубации лейкоцитов при 37° в условиях влажной камеры с газовой смесью (2% углекислого газа и 98% атмосферного воздуха) рН среды оставался в пределах 7,2—7,4. Приготовленная агарозная среда использовалась в течение суток.

Для постановки исследования порцию отмывых лейкоцитов (исходная концентрация  $2 \cdot 10^8$  в 1 мл) инкубировали 30 мин в смеси с туберкулином (12,5; 25; 50 или 100 мкг/мл) и только после этого вносили на дно пустой лунки в агарозе в количестве  $1,5 \cdot 10^6$ . В контрольные лунки в том же количестве разливали взвесь клеток в фосфатном буфере без аллергена. Мигрирующие клетки обнаруживались между слоем агарозного геля и стеклом. Эритроциты в эту зону не проникали, что доказывало активную миграцию элементов, а не их пассивное скопление. По всей зоне миграции лейкоциты состояли как из гранулоцитов, так и из мононуклеаров.

В специальной проверочной работе Clausen (1973) пришел к выводу, что применение для теста задержки миграции лейкоцитов агарозного геля повысило его чувствительность по сравнению с капиллярной техникой. В том случае, если данная модификация позволит получать стабильные результаты, она несомненно найдет широкое применение.

## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ

Вопросы применения феномена агглютинации лейкоцитов в целях специфической диагностики аллергии *in vitro* неоднократно привлекали внимание иммунологов и клиницистов. Наибольшую известность получила работа Augustin (1964). Используемая ею методика состояла в инкубации лейкоцитов обследуемого больного со специфическим аллергеном (прямой тест) или инкубации с аллергеном лейкоцитов здорового донора после их предварительного контакта с сывороткой больного (непрямой тест). Для регистрации агглютинации могут применяться различные способы и, в частности, окраска смеси флюорохромом с последующей люминесцентной микроскопией. Поскольку инкубация лейкоцитов с аллергеном сравнительно редко приводила к агглютинации, Augustin для усиления реакции начала добавлять к проинкубированным и отмытым от аллергена клеткам гипериммунную (по отношению к препарату) кроличью сыворотку. Попытки использовать эту пробу для диагностики поллинозов показали (И. Е. Бермонт, 1971), что как в прямом, так и в непрямом тесте не представлялось возможным исключить неспецифическую адсорбцию аллергена лейкоцитами и, следовательно, их неспецифическую агглютинацию, вызванную в конечном итоге инкубацией с преципитирующей кроличьей сывороткой. По мнению И. Е. Бермонта, этим и объясняется тот факт, что в специальных дополнительных исследованиях с непрямым тестом «сенсibilизация» регистрировалась и в условиях применения лейкоцитов и сыворотки здоровых доноров.

К этой же категории реакций относится и агломерационная проба по А. Н. Мацу (1965), представляющая собой модификацию теста по Fleck (1946). Неспецифический лейкоцитарный тест по Fleck состоит в определении в «толстой капле» процента склеившихся лейкоцитов (подсчет по диаметру капли 1000 клеток) после 3-часовой инкубации цитратной крови в термостате при 37°. Ежечасно кровь перемешивают. За склеившиеся лейкоциты принимают любую агрегацию элементов (от 3 и более). Агломерационная проба предусматривает получение от больного 0,2 мл крови (на каждый опытный или контрольный тест) и ее 2-часо-

во время инкубирования с одним антикоагулянтом — 3,8% раствором цитрата натрия (контроль) или с антикоагулянтом в смеси с лекарственным или другим препаратом (10—50 мкг/мл). Проба считается положительной, если показатель лейкоергии в опыте на  $\frac{1}{3}$  превышает показатель контроля. Результаты применения агломерационной пробы для характеристики лекарственной аллергии, по мнению некоторых авторов, не позволяют рассматривать ее как достаточно специфический тест. Более подробно эти работы обсуждаются в главе 14.

## Г л а в а 10

### РЕАКЦИЯ ДЕГРАДУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

---

Вопрос об участии тучных клеток рыхлой соединительной ткани в реализации проявлений гиперчувствительности немедленного типа в последние годы все чаще привлекает внимание исследователей. Несмотря на то что с момента их первого описания прошло около 100 лет, вопрос происхождения тучных клеток все еще служит предметом дискуссии. Концепция, рассматривавшая тучные клетки как результат дифференцировки фибробластов, вынуждена конкурировать в настоящее время с утверждением о возникновении тучных клеток из элементов лимфоидного ряда. Наблюдениями группы Csaba (1963) и др. было установлено, что *in vitro* тучные клетки могут возникать в тканях вилочковой железы.

Весьма сложные вопросы встали перед исследователями в процессе изучения функций тучных клеток, в частности при определении их роли в балансе гистамина, гистамина и серотонина. Lagunoff с сотр. (1964) показали, что содержащийся в гранулах тучных клеток гепарин благодаря наличию в нем сульфатных групп обладает способностью связывать гистамин. Основываясь на этих фактах, В. В. Виноградов (1968) приходит к следующим заключениям: 1) в тучных клетках белковый компонент гранул включает в себя инактивированный протеолитический фермент, с которым ковалентными и ионными связями



соединен гепарин; 2) гепарин нестойкими ионными связями связывает гистамин. Последний может быть легко вытеснен из этой связи так называемыми гистамин-либераторами, образующимися, в частности, при аллергических реакциях и воспалении. Это обстоятельство позволило Г. В. Ковалевскому (1968) заметить, что по своей структуре гранулы могут рассматриваться в качестве микроионообменников, допускающих свободную конкуренцию катионов (гистамин, серотонин) за кислые группы гепарина. В зернистости тучных клеток были обнаружены также разнообразные ферменты, включая щелочную и кислую фосфатазы.

Исходя из интересующих патофизиологов и аллергологов аспектов проблемы, уместно обратить внимание на способность тучных клеток не только выбрасывать, но и фиксировать из внешней среды гистамин и концентрировать его в гранулах. По наблюдениям Green, Day (1963) и др., насыщение тучных клеток гистамином может в 100 и более раз превышать его концентрацию в среде. Поглощение гистамина, как и секреция гепарина, происходит без нарушения клеточных оболочек.

Г. В. Ковалевский (1968) приводит обширную литературу, указывающую, по-видимому, на сходство поверхностных мембран тучных клеток с гамма-глобулиновыми компонентами сыворотки крови. Добавление к тучным клеткам нормальной крысы антисыворотки к ее гамма-глобулинам вызывало дегрануляцию клеток с освобождением до 80 % содержащегося в них гистамина. Было отмечено, что лизис тучных клеток и выделение гистамина возникают лишь в условиях, когда реакция антиген — антитело воспроизводится в непосредственной близости от цитоплазматических мембран при концентрации комплемента более высокой, чем это необходимо для реакции гемолиза.

Приведенные факты вполне согласуются с наблюдениями патофизиологов о заметной роли тучных клеток в механизме возникновения анафилактического шока (А. Д. Адо, 1970). Оценивая в этой связи те шоковые состояния, которые изредка возникают при диагностическом введении аллергенов в организм больного, уместно указать, что, по данным Л. М. Ишимовой (1971), природа антител, сенсибилизирующих тучные клетки, в определенной мере сходна с реакинами.

Трудности воспроизведения прямого и непрямого базофильных тестов, равно как и их недостатки, побудили Schwartz с сотр. (1965) использовать вместо базофилов

перитонеальные тучные клетки нормальных крыс. В отличие от базофилов кролика эти элементы не имеют тенденции к спонтанной дегрануляции. Авторы подчеркнули меньшую сложность получения клеток перитонеальной взвеси по сравнению с техникой выделения лейкоцитов из цельной крови и простоту дифференциации тучных клеток. Широкое диагностическое использование не прямой дегрануляции тучных клеток в аллергологической практике было осуществлено Л. М. Ишимовой и Л. И. Зеличенко (1967), а позднее по отработанной ими методике — С. Х. Хутуевой (1970) и Л. В. Лусс (1971).

Реакция не прямой дегрануляции тучных клеток (в модификации Л. М. Ишимовой и Л. И. Зеличенко). Постановка теста предусматривает использование следующих ингредиентов: 1) сыворотки крови обследуемого больного; 2) перитонеальных тучных клеток крысы; 3) специфического аллергена растительного или пищевого происхождения, рассматриваемого как фактор сенсibilизации; 4) заведомо неспецифического (контрольного) аллергена.

Кровь для исследования от больного обычно получают путем прокола кожи пальца или берут из вены в количестве, определяемом объемом предстоящего исследования: на каждый опытный препарат требуется 0,05 мл сыворотки и столько же сыворотки для контроля. Сыворотку получают путем центрифугирования крови в течение 20—30 мин при 1500 об/мин. В реакции можно использовать как свежую сыворотку, так и сыворотку, сохраняемую при температуре  $-20^{\circ}$ . Специальные эксперименты показали, что не прямая дегрануляция тучных клеток не происходит в бескомплементарной среде. Так, если в инактивированной нагреванием сыворотке без комплемента число дегранулированных клеток не превышало 2% (Л. И. Зеличенко, 1969), то при использовании той же сыворотки, но не подвергшейся инактивации, частота дегрануляции достигала 60%. При добавлении к перитонеальным клеткам крысы инактивированной сыворотки, специфического аллергена и комплемента человека реакция полностью восстанавливалась.

При получении перитонеальных тучных клеток крысы (лучше использовать самцов весом 140—200 г) животных забивают путем кровопускания из сонной артерии, после чего им вводят внутривенно 6—8 мл подогретого ( $37^{\circ}$ ) раствора Тироде без глюкозы или раствора «Хемоцелл» (ГДР). В «Хемоцелл» входит желатина (8,5 г), NaCl

(8,5 г), KCl (0,38 г), CaCl<sub>2</sub> (0,7 г) и дистиллированная вода (до 1 л). В продолжение 1—1½ минут производят легкий массаж передней стенки живота и затем по его средней линии делают ножницами послойный разрез длиной 1,5—2 см. Осторожно переворачивают тушку разрезом вниз с тем, чтобы из нее свисали петли кишечника. Подставляют к петлям пробирку, смоченную гепарином. При этом с петель кишечника в пробирку начинает стекать перитонеальная взвесь. Для получения антикоагулирующего эффекта ее осторожно перемешивают и в продолжение всего исследования хранят при 37°.

С целью отделения тучных клеток от остальных клеточных элементов перитонеальной взвеси применяют метод дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Сахароза может быть заменена полисахаридом — фикоλλом, концентрированным раствором альбумина или другими высокомолекулярными соединениями. Особенность таких растворов состоит в том, что они не стимулируют спонтанную дегрануляцию тучных клеток. Для проверки этого клетки перед каждым новым исследованием просматривают под микроскопом. При обнаружении дегрануляции взвесь тучных клеток бракуют.

При постановке теста используют предметные стекла, предварительно окрашенные 0,3% раствором нейтрального красного, приготовленным на абсолютном спирте. На предметное стекло наносят 0,05 мл исследуемой сыворотки крови, 0,05 мл перитонеальной взвеси, полученной от крысы, и 0,05 мл опытного или контрольного аллергена. Смесь накрывают покровным стеклом, края которого промазаны вазелином. Препараты на 10—15 мин помещают в термостат при 37° и затем микрофотографируют. Каждому опыту сопутствуют три контроля: 1) взвесь тучных клеток и аллерген, 2) взвесь тучных клеток и исследуемая сыворотка, 3) взвесь тучных клеток, исследуемая сыворотка и неспецифический аллерген например, один из пищевых аллергенов). Допустимая дегрануляция в контролях — не более 40% от числа сосчитанных клеток.

Оценка теста производится путем микроскопии препарата (×280), в котором просматривается 100 тучных клеток, не соприкасающихся друг с другом. Клетки делятся на две категории: нормальные и дегранулированные. Нормальные клетки обычно имеют округлую форму, реже — удлиненную или веретенообразную. Их протоплазма компактно заполнена гранулами малинового цвета. Ядро клет-

ки светлое. Иногда на него накладываются окрашенные гранулы (рис. 17, см. на цветн. вкл. между стр. 96—97).

Дегрануляция тучных клеток выражается в ослаблении окраски гранул, в цитоплазме обнаруживаются вакуоли. Края клетки могут становиться разбухшими, неровными, с бесцветной «коронкой», разрывом и «выходом» гранул. Клетки, потерявшие окраску полностью, имеют вид «медовых сот». Тест считается отрицательным, если число дегранулированных клеток не превышает 10%. Процент дегранулированных тучных клеток определяется путем вычитания наибольшего числа дегранулированных клеток в одном из контролей из результатов подсчета клеток в опытном препарате. Так, если число дегранулированных клеток в опытном препарате составляет 16%, а в одном из контролей доходит до 8%, то конечный результат будет составлять 8%. В этом случае тест учитывается как отрицательный. При резко положительной реакции окончательный результат может превышать 30%. Условно выделяют три степени положительной реакции: 1) слабоположительную (+) — от 10 до 20% дегранулированных клеток; 2) положительную (++) — от 20 до 30%; 3) резко положительную (+++) — от 30% и более.

В работе Л. И. Зеличенко (1969) обследовали больных поллинозами и лиц с явлениями пищевой аллергии. Большинство поллинозов оказалось связанным с сенсибилизацией к пыльце злаковых трав (тимофеевка луговая, овсяница луговая, ежа сборная). Реже встречалась аллергия к полыни, орешнику и ольхе. При первичном обследовании больных, сенсибилизированных пылью злаковых трав, непрямой тест дегрануляции тучных клеток оказался положительным в 78—90% наблюдений. Подавляющее число реакций имело выраженность ++ или +++ . Несколько меньшая степень выраженности реакции наблюдалась при использовании аллергенов из пыли деревьев, что может быть объяснено невысокой сенсибилизирующей активностью самой пыли. При сопоставлении результатов диагностики поллинозов, осуществленной путем одновременного применения тестов непрямой дегрануляции тучных клеток и базофилов у одних и тех же больных детей (С. Х. Хутуева, 1970), показатели обеих реакций совпали (87 и 84,7%).

Апробация метода для диагностики пищевой аллергии производилась на контингенте детей дошкольного возраста с непереносимостью коровьего молока (Л. В. Лусс, 1971).

В качестве контрольного (неспецифического) препарата использовали яичные, рыбные или мучные аллергены. В группе больных с клинически выраженными реакциями на провокационную пробу (в пищевой рацион детей включалось молоко) дегрануляция тучных клеток наблюдалась в 68,6% случаев. Среди детей, у которых реакции на молоко возникали в прошлом, а во время обследования отсутствовали, положительные пробы наблюдались значительно реже в 41,6% случаев. Определенный интерес представляют также и результаты обследования двух контрольных групп: среди 53 детей с аллергическими заболеваниями, не связанными с сенсибилизацией к молоку, дегрануляция клеток возникла у 24,5%, а среди 30 практически здоровых детей — у 3,3%. По совокупности полученных данных клеточный тест оказался более значимым по сравнению с реакциями кожи. При постановке скарификационных проб с коровьим молоком, разведенным физиологическим раствором (1:10), в первой группе (больные дети) число положительных реакций составило 52%, во второй (анамнестическая непереносимость молока) — 28,9%, в группе здоровых детей — 17,4%. Можно допустить, что тест не прямой дегрануляции тучных клеток представит интерес и для оценки сенсибилизирующих свойств некоторых вакцин, и прежде всего препаратов типа анатоксинов (Ф. Л. Лейтес, М. И. Семашко, 1968). Изучение этой проблемы — задача ближайшего будущего.

Тест торможения дегрануляции тучных клеток (Schwarz, Vardinon, 1966) является модификацией реакции, при которой происходит прямая дегрануляция тучных клеток, полученных от предварительно сенсибилизированного животного. В основу теста положена сравнительная оценка дегрануляции тучных клеток в двух системах. Одна из них включает в себя тучные клетки крысы, сенсибилизированной определенным аллергеном, и этот же аллерген. В этой системе дегрануляция клеток зависит только от дозы аллергена. Вторая система отличается от первой внесением в нее сыворотки больного. В том случае, если сыворотка содержит специфические антитела (по отношению к изучаемому препарату), часть аллергена связывается в реакции антиген—антитело. Чем выше титр антител, тем большая часть аллергена окажется связанной и тем менее выраженной будет дегрануляция тучных клеток. Разница в показателях двух систем (максимальная выраженность в первой и феномен «торможения» во второй) отразит

наличие специфических антител в сыворотке крови. Используя постановку реакции с разведенной сывороткой, можно получить представление о титре специфических антител (выявление наибольшего разведения, при котором обнаруживается достоверное «торможение» дегрануляции тучных клеток). В аллергологической практике данная модификация реакции используется редко.

## Г л а в а 11

### РЕАКЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ ГИСТАМИНА КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ АЛЛЕРГИИ

---

В предыдущих разделах мы уже отмечали, что лейкоциты гранулоцитарного ряда активно участвуют в выработке гистамина и содержат его в значительных количествах. В наибольшей концентрации гистамин обнаруживается в базофилах (50—60% всего гистамина крови), и это несмотря на то, что от общего числа лейкоцитов базофилы составляют менее 1%. У разных лиц содержание гистамина в базофилах колеблется весьма значительно: от 0,015 до 0,3 мкг на  $1,5 \cdot 10^7$  клеток. Связь между освобождением гистамина и реакцией сенсибилизированных клеток на аллерген впервые была отмечена Katz и Cohen (1941). Добавляя антиген к крови больных аллергическим заболеванием, они регистрировали повышение концентрации гистамина в плазме. В 1963—1966 гг. Lichtenstein с сотр. выполнили серию работ, существенно продвинувших наши представления о механизме этого феномена. Было отмечено, что на выделение гистамина из лейкоцитов крови больных поллинозом существенно влияет концентрация двухвалентных катионов, и прежде всего кальция. Освобождение гистамина, вызываемое кальцием, потенцируется катионом магния. Наиболее интенсивное выделение гистамина наблюдалось при pH 7,3—7,4 и температуре около 37°. В этих условиях реакция почти полностью заканчивалась за 40—60 мин. В ряде работ для сохранения жизнеспособности лейкоцитов в среду (на время выделения клеток, их центрифугирования и инкубации) добавляли неспецифический белок (его концентрация не должна выходить за пределы

0,1%; превышение этого уровня тормозит процесс выделения гистамина). Цельная или разведенная сыворотка крови ингибирующими свойствами не обладает. Среда, используемая для отмывания клеток, не должна содержать двух валентных катионов.

Lawrence и соавт. (1966) провели исследование, направленное на установление условий, сопутствующих выделению лейкоцитами гистамина при воспроизведении анафилактического шока и в процессе иммунной цитотоксической реакции. Оказалось, что освобождение гистамина в результате анафилактического шока может возникать и в отсутствие факторов сыворотки в жидкой среде. Эта форма реакции не сопровождалась существенной потерей клетками ионов калия даже тогда, когда выход в среду гистамина достигал 90% от его абсолютного количества. В противоположность этому иммунные цитотоксические реакции зависели от присутствия свежей сыворотки, вызывали ускоренный выход внутриклеточного калия, но гистамин при этом терялся в минимальной степени. Заметному освобождению гистамина в результате иммунных цитотоксических реакций всегда предшествовала потеря лейкоцитами калия, вслед за чем развивались необратимые повреждения клеток.

С несколькими иными позиций вопрос был рассмотрен Ishizaka с сотр. (1972). Изучая взаимодействие аллергена с IgE, а также IgE с анти-IgE, они пришли к заключению, что IgE содержится только на поверхности базофилов, реакция которых и определяет появление гистамина в среде. Учитывая, что гистамин обнаруживался и тогда, когда в систему вносился анти-IgG (IgG фиксируется прежде всего на нейтрофилах и моноцитах), авторы выполнили комплекс наблюдений, в ходе которых взвесь лейкоцитов специфически сенсибилизированных больных делили на полинуклеарную, моноклеарную и базофильную фракции (25% базофилов). После воздействия аллергена лишь в одном из 30 случаев концентрация гистамина в гранулоцитарной фракции (она содержала 0,2% базофилов) оказалась выше, чем в моноклеарной (1,7% базофилов). В целом же концентрация гистамина в среде во всех трех фракциях коррелировала с числом базофилов. На этом основании авторы сделали вывод, что иммунологическая реакция между IgG и анти-IgG на полиморфноядерных лейкоцитах не находится в непосредственной связи с процессом выделения гистамина элементами крови. Заметим,

что столь категоричное заключение находится в противоречии с материалами Ranadive, Cochrane (1971), указавших на возможность потенцирования выброса базофилами гистамина за счет лизосомальных фракций нейтрофилов. При 15-минутной инкубации базофилов крови с 3—4 мкг белка этих фракций происходило освобождение 30—40% всего гистамина базофилов крови. Если учесть, что под воздействием специфических антигенов нейтрофилы способны секретировать лизосомальные ферменты, сохраняя при этом свою жизнеспособность, то их участие в механизме выделения базофилами гистамина представляется вполне реальным. К этому следует добавить, что гранулы из взвеси лейкоцитов человека, содержащие гистамин, и лизосомальные гранулы могут быть разделены путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (0,35 М). В то время как выделение гранул гистамина практически заканчивается в условиях 20-минутного центрифугирования при 3900 g, лизосомальные гранулы оседают лишь при ускорении, равном 14 000 g (Pruzansky, Patterson, 1968).

Представляет интерес сообщение May с сотр. (1968). Изучая выделение гистамина лейкоцитами крови у 250 детей при постановке проб с аллергенами и лекарственными препаратами, авторы одновременно оценивали и способность сыворотки пациента нейтрализовать антиген. Оказалось, что сезонность, как и ряд других факторов, влияла на этот процесс, вследствие чего был сделан вывод о большей лабильности гистаминного теста по сравнению с кожной пробой. Впрочем, как уже отмечалось, известная стереотипность в интенсивности кожных реакций в различные периоды жизни ребенка и в различных условиях является скорее их недостатком, чем достоинством. Что же касается надежности реакции на гистамин, то, по мнению Lichtenstein и Osler (1964), она выражается почти в полном совпадении результатов трехкратного его определения у одних и тех же доноров. Специфичность и высокая чувствительность обсуждаемого теста были отмечены Levy (1969), наблюдавшим отчетливое выделение лейкоцитами гистамина при использовании аллергена в концентрации  $10^{-6}$  мкг белка в 1 мл и корреляцию этой пробы с выраженностью аллергического синдрома у больного. Однако было бы ошибкой полагать, что такая степень чувствительности сопутствует любым проявлениям аллергии и достигается при применении любых диагностических препаратов. Так, например, выявление алиментарной аллергии



этим путем себя не оправдало, так как обычный пищевой экстракт не является достаточно специфичным аллергеном.

Совокупность опубликованных к настоящему времени данных позволяет считать, что выделение гистамина является энергозависимым процессом, который требует неповрежденных и функционально активных лейкоцитов. Важно подчеркнуть, что для таких элементов, как тучные клетки, секреция медиатора не всегда сопровождается видимой дегрануляцией.

На первых этапах изучения теста с гистамином складывалось впечатление, что он имеет преимущественное отношение к проявлениям неинфекционной аллергии. Между тем ряд исследований, в частности Martin и White (1969), показали, что и бактериальные препараты вызывают аналогичный эффект. В своей работе Martin и White использовали два различных в антигенном отношении штамма стафилококка. Один из них содержал только кислый мукопептидный антигенный комплекс, а второй, в дополнение к нему, — и белковый антиген А. Если неочищенный антигенный препарат первого штамма вызывал освобождение гистамина в пределах «спонтанной» реакции в контроле (10% всего гистамина лейкоцитов крови), то на препарат второго штамма выделялось в 5 раз больше гистамина ( $50 \pm 6,7\%$ ), причем до 40% медиатора приходилось на фракцию белкового антигена А. Эти результаты были получены при использовании крови практически здоровых людей, среди которых аллергия к стафилококку также встречается достаточно часто. Можно думать, что инкубация антигенов с лейкоцитами высокосенсибилизированных больных сопровождалась бы более интенсивным выделением гистамина.

Феномен выделения гистамина лейкоцитами крови не остался незамеченным аллергологами. Его практическое применение развивается в двух направлениях: для количественной оценки проявлений инфекционной или неинфекционной сенсибилизации больных и в качестве метода контроля и стандартизации специфической активности выпускаемых аллергенов. До последнего времени большинство аллергологических наблюдений было выполнено в условиях инкубации выделенных из крови больного лейкоцитов в смеси с бытовыми аллергенами или аллергенами из пыльцы растений (60—90 мин при  $37^\circ$ ). Часть лейкоцитной взвеси должна инкубироваться без аллергена (контроль). Первые методики предусматривали использование

венозной крови в объеме 25 мл. Затем были предложены способы, в которых количество получаемой крови было уменьшено до 10 мл. Мау с сотр. (1970) рекомендуют набирать 10 мл крови в шприц с 0,1 мл раствора гепарина и 2 мл 3% раствора декстрана (в 3% растворе глюкозы). Молекулярный вес декстрана 280 000. Шприц в течение 30—60 мин оставляют в вертикальном положении иглой вверх. Образовавшийся слой плазмы со взвешенными в нем лейкоцитами сливают и после центрифугирования и отмывания клеток добавляют к ним аллерген. Авторы указывают, что количество получаемых лейкоцитов достаточно для 10 параллельных проб.

Завершив инкубацию лейкоцитов с аллергеном, проводят определение освободившегося гистамина флюорометрическим способом. В его основу положена реакция конденсации гистамина с О-фталевым альдегидом, вследствие чего возникает сильно флюоресцирующее соединение. Обоснование и детальное изложение данного метода приведены в монографии Udenfriend (1965).

В связи с установлением диагностических возможностей теста непрямой дегрануляции тучных клеток крыс в последние годы появились сообщения об определении гистамина, выделяемого этими элементами в присутствии комплекса антиген—антитело. По данным Gillman и Haddad (1972), поступление гистамина из тучных клеток крыс линии Вистар в контрольную среду оказалось весьма незначительным. Инкубация только с сыворотками, содержащими реагены, не снижала эффект реакции, вызванной последующим контактом со специфическим антигеном или анти-IgE. В работе Evans и Tomson (1972) отмечается, что оптимальные условия освобождения тучными клетками гистамина близки к условиям, необходимым для аналогичной реакции со стороны лейкоцитов крови человека: присутствие ионов кальция и магния, температура 37° и время инкубации от 60 до 90 мин. Существенное отличие в условиях постановки реакции тучных клеток заключается в поддержании иного значения рН, а именно 7,6—8,2.

Реакция выделения клетками гистамина находится еще в стадии экспериментального изучения. Необходимо глубокое изучение кинетики реакции. Остается неясным, в какой мере на освобождение гистамина клетками влияет стабильность комплекса антиген—антитело, участвуют ли в реакции все сенсibilизированные лейкоциты, целесообразно ли использовать в клеточных реакциях аллергены,

предназначенные для постановки кожных проб, и какова должна быть их оптимальная концентрация. Можно не сомневаться, что ответы на поставленные вопросы будут получены в ближайшие годы. Однако уже теперь можно утверждать, что среди методов специфической диагностики *in vitro* тест регистрации гистамина в культуральной среде представляет особый интерес.

## Г л а в а 12

### ПРИМЕНЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ В НЕПРЯМЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ АЛЛЕРГИИ

---

Ряд авторов (Nota *et al.*, 1964) наблюдали феномен, состоящий в том, что клетки лимфоидного ряда, полученные от иммунизированного гетерогенными эритроцитами животного, приобретали способность фиксировать на своей поверхности соответствующие эритроциты *in vitro*. Такая реакция была названа «иммуноцитоприлипание». Позднее Chuchaud и Frei (1967) представили данные, согласно которым эта же реакция воспроизводилась с помощью овечьих формализированных и танизированных эритроцитов, на которые предварительно фиксировали туберкулин или препараты лекарственного ряда (пенициллин, сигмамин и др.). Формализация эритроцитов может проводиться по одной из общепринятых методик. Авторы выполняли ее по Crizmas (1960). Для танизирования каждой рабочей порции формализированных и отстоявшихся эритроцитов использовали 5 мл таниновой кислоты в разведении 1:2000 при экспозиции 10 мин. Затем элементы трижды отмывали в фосфатном буфере (рН 7,2). Для заключительного суспендирования использовали 5 мл буфера. В течение ночи клетки выдерживали при 4°. Фиксация аллергена происходила в течение 30 мин при 20°: к 1 мл взвешенных эритроцитов добавляли 4 мл фосфатного буфера с рН 6,4 и 1 мл солевого раствора с туберкулином (конечная концентрация 10 туберкулиновых единиц на 1 мл) или с 2,5 мг лекарственного препарата. Вслед за этим, после двукратного отмывания в растворе Хенкса, содержавшего нормаль-

ную человеческую сыворотку (1 : 10), эритроциты вновь ресуспендировали в 2 мл раствора Хенкса. Предварительно сыворотку подвергали декомплементированию (прогревание 30 мин при 56°).

Для постановки теста с лимфоцитами больного использовали соотношение 4 : 1 (например, 20 млн. эритроцитов и 5 млн. лимфоцитов). Раствором Хенкса объем каждой пробы довели до 1 мл. Одновременно ставили два контроля: 1) обработанные антигеном эритроциты инкубировали с лимфоцитами несенсибилизированного донора; 2) не обработанные антигеном эритроциты инкубировали с лимфоцитами обследуемого лица. Пробы инкубировали 2 ч при 37° во вращающемся миксере. Все этапы работы выполняли в стерильных условиях. Реакцию оценивали в счетной камере, применяя тонкие покровные стекла, где при просмотре 2000 лимфоцитов сосчитывалось число «розеток». Для исключения возможности регистрировать в качестве «розетки» случайное соприкосновение клеток авторы рекомендуют проверять наличие «розеток» повторно, в конце просмотра препарата. За «розетку» принимается лимфоцит с устойчивым прилипанием к нему не менее 3 эритроцитов. Поскольку «розеткообразование» выявилось лишь у половины сенсибилизированных лиц, было сделано предположение, что при этом обнаруживались лишь те антитела, которые комплементировались с лимфоцитами.

Иная модификация феномена с использованием эритроцитов, адсорбировавших аллерген, была разработана Л. А. Труновой (1970) и обозначена как РАЭЛ. Первоначально она проверила и отвергла предположение о том, что контакт лейкоцитов сенсибилизированного больного с аллергеном ведет к выделению токсического вещества, способного обусловить лизис эритроцитов. Фактически же в таких условиях обнаруживалось «склеивание» эритроцитов. В этой связи для регистрации сенсибилизации лимфоцитов крови к бактериальному и тканевому аллергенам был использован принцип непрямой гемагглютинации.

Постановка каждой реакции между нагруженными антигеном аутоэритроцитами и лимфоцитами требует разделения крови больного на взвесь лейкоцитов и взвесь эритроцитов. С этой целью из вены получают не менее 10 мл крови. Кровь гепаринизируют и смешивают (9 : 1) с 10% стерильной желатиной. Спустя час плазменный слой с лейкоцитами отсасывают и для исключения последующих спонтанных реакций лейкоциты 2—3 раза отмывают от

плазмы средой № 199. Некоторую примесь эритроцитов устраняют путем их лизиса. Для этого клеточный осадок ресуспендируют в 2 мл 3,5% раствора хлорида натрия с нейтральным рН и к нему добавляют 6 мл холодной дистиллированной воды. После легкого встряхивания (30 с) всю жидкую фазу отбрасывают, а лейкоциты вновь смешивают с 1—2 мл среды № 199. Подсчитывают клетки в 1 мм<sup>3</sup> и их число с помощью среды № 199 доводится до 800 000—1 000 000 в 1 мл. Осадок эритроцитов также трижды отмывают в физиологическом растворе и из него готовят 1% взвесь (9,9 мл физиологического раствора с 0,1 мл промытого осадка).

В работе использовали стрептококковый аллерген (0,1 мл на пробу) и соединительнотканый антиген. Последний готовили путем десятикратного замораживания (—20°) и оттаивания 4—5-суточной культуры фибробластов эмбриона человека или биопсированного кожного лоскута.

Получавшийся субстрат в течение 10 мин центрифугировали при 3000 об/мин. Концентрация белка в препарате колебалась от 0,01 до 0,1 г%. Для конъюгации препарата 0,3 мл 1 % взвеси эритроцитов инкубировали 15 мин при 37° с 0,1 мл стрептококкового аллергена или 0,3 мл тканевого антигена. Обработанные таким образом эритроциты соединяли в равных объемах с лейкоцитами. Общий объем каждой пробы доводили физиологическим раствором до 1 мл. Всю систему инкубировали 30 мин при 37°, выдерживали 12—18 ч при 4°, после чего производили учет геммагглютинации: резко очерченный осадок эритроцитов — реакции нет; хлопьевидный осадок, округленный зоной комочков агглютинировавшихся эритроцитов — реакция +; пленка с фестончатыми кружевными краями склеившихся эритроцитов — ++; пленка, покрывающая все дно с просветами или без них, — +++ и ++++.

Каждому исследованию сопутствует оценка геммагглютинации в трех контрольных пробах: 1) взвесь эритроцитов, 2) взвесь эритроцитов с добавлением лейкоцитов, 3) взвесь эритроцитов, нагруженных аллергеном (антигеном).

К порциям клеток в каждой пробе приливают физиологический раствор до 1 мл и все пробы инкубируют вместе с опытной системой. Тест РАЭЛ считается положительным при условии его выраженности в опытной пробирке на ++ и отсутствии геммагглютинации в контролях.

Материалы изучения аллергии к соединительнотканному антигену выявили различия в частоте РАЭЛ между здоровыми и больными хроническим тонзиллитом. Однако различия между здоровыми людьми и больными с «неспецифическими» процессами и между последними и больными с хроническим тонзиллитом оказались несущественными.

Наиболее часто положительные результаты регистрировались в активной фазе ревматизма. Вместе с тем Л. А. Трунова обнаружила факты, объяснение которых требует дальнейших наблюдений. Так, оказалось, что корреляционная связь между РАЭЛ и цитопатическим тестом существует только у взрослых. При микроскопии препаратов среди эффекторных клеток, образывавших «розетки», обнаруживались моноциты и гранулоциты. При параллельной постановке РАЭЛ с тканевым и стрептококковым препаратами среди трех групп людей (здоровые, с хроническим тонзиллитом или ревматизмом) количество положительных проб на каждый из аллергенов совпало: они возникали у одних и тех же больных и имели однозначную выраженность. Из этого следует, что специфичность теста должна быть подвергнута дальнейшему изучению с применением (в целях контроля) более широкой номенклатуры аллергенов.

## Г л а в а 13

### РАДИО-АЛЛЕРГО-СОРБЕНТНЫЙ ТЕСТ (РАСТ)

---

Wide, Bennich, Johanssen (1967) разработали метод выявления в сыворотке больных специфических антител класса IgE к аллергенам неинфекционного ряда. При разработке данного теста авторы исходили из того, что концентрация иммуноглобулинов класса IgE у больных с различными аллергическими заболеваниями (поллинозы, бронхиальная астма) находилась на более высоком уровне, чем у лиц контрольных групп. Предположив, что данный иммуноглобулин весьма близок к кожно-сенсibilизирующим антителам—реагинам, они применили для их идентификации чувствительный радио-аллерго-сорбентный тест. Его прин-

ции состоит в следующем. Аллерген, используемый для диагностики, фиксируют полимером. В качестве последнего нашла применение одна из марок нерастворимого декстрана, активированного цианоген-бромидом. При этом образуется нерастворимый полимер-аллергенный конъюгат, который добавляется к исследуемой сыворотке. Если в сыворотке больного присутствуют специфические антитела, возникает реакция антиген—антитело. Затем, после удаления из системы всех несвязанных в реакции компонентов, к конъюгату добавляют порцию специально приготовленной моноспецифической сыворотки, содержащей антитела против IgE, которые до этого метятся одним из радиоактивных изотопов (например,  $I^{125}$ ). Добавление меченных антиантител создает условия для новой специфической реакции с антителами IgE, находившимися в сыворотке больного. Суммарное количество вступивших в реакцию меченых антител определяется по степени радиоактивности отмытого конъюгата с помощью сцинтилляционного счетчика.

Конъюгация осуществлялась путем совмещения 1 мл аллергена (концентрация 10 000 PNU) со 100 мг сефадекса G-25, активированного цианоген-бромидом. Затем частицы суспендировали в концентрации 1 мг на 1 мл 0,1 М физиологического раствора (рН 7,4) с буфером «трис», содержащего 1% твин-20 и 0,2% альбумина бычьей сыворотки.

Сефадекс-аллергенные конъюгаты оставались стабильными при хранении при 4—20° не менее 3 мес. Изоляцию IgE производили при помощи иммуносорбентной техники, описанной Robbins и соавт. (1967). Меченые антитела отделяли от остальных продуктов и свободного йода с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-150. Специфическая активность оценивалась в 50—70 мКи на 1 мг.

При постановке теста существует две ступени: 1) 5—50 мкл сыворотки больного смешивают с 0,5 мл суспензии полимер-аллергенного конъюгата. Пробирки (50×10 мм) со смесью в течение 6—24 ч инкубируют при комнатной температуре в условиях медленного вертикального вращения. Затем суспензию центрифугируют при 3000 об/мин и трижды отмывают в 0,1 М физиологическом растворе (рН 7,4), с буфером «трис» и 1% твин-20. Супернатант отбрасывают, и в пробирке вместе с частицами остается около 0,2 мл отмывочного раствора. 2) 100 мкл меченых антител (против IgE) в концентрации, соответствующей примерно

40 000 импульсов, вносят в пробирку, содержащую отмываемые частицы. Смесь повторно инкубируют, центрифугируют и отмывают по схеме, указанной для первого этапа, после чего определяют активность с помощью сцинтилляционного счетчика. Параллельно авторы применяли контроли, в которых вместо сыворотки больного аллергическим заболеванием вносили сыворотку здорового человека или буферный раствор. Получавшиеся сыворотки могли храниться при  $-20^{\circ}$ .

Результаты оценивались как положительные (+), если степень радиоактивности в препарате от больного была в 2—5 раз выше, чем в контролях. При более ощутимых различиях результаты оценивались как ++.

Было обнаружено, что РАСТ у 96% совпадал с провокационными пробами. В реакции испытывались различные эпидермальные аллергены: шерсть собаки, кролика, кошки, перхоть лошади, а также аллергены из пылицы трав и деревьев.

Высокое соответствие РАСТ тем результатам диагностики, которые были получены при введении неинфекционных аллергенов в организм обследованных больных, создает определенные перспективы для замены небезопасных провокационных проб совершенно безопасным методом диагностики *in vitro*.

Конечно, на этом пути могут встретиться и определенные трудности. Так, уже на первых этапах применения радио-аллерго-сорбентного теста обнаружилось (Johansson, Bennich, Foucard, 1973), что на получаемые результаты оказывают влияние высокий уровень блокирующих антител в сыворотке крови и присутствие антител к гамма-глобулину животных. Блокирующие факторы, подавляя РАСТ, могут быть причиной ложноотрицательных реакций.

Заслуживает внимания сообщение Ceska и соавт. (1972) об использовании несколько модифицированного теста РАСТ для сравнительной оценки специфической активности нескольких одноименных неинфекционных аллергенов.

С этой целью авторы применили специально изготовленные диски из фильтровальной бумаги, активированные цианоген-бромидом. Таким образом, новый тест, возможно, найдет применение и для стандартизации аллергенов при их серийном выпуске и для выяснения допустимых сроков хранения.



## МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИИ

В современных условиях медикаментозные препараты являются неотъемлемым компонентом лечебного воздействия на организм человека при различных патологических процессах. Однако по мере расширения номенклатуры лекарственных средств медицинская статистика регистрирует нарастание различных по своей природе осложнений, обусловленных их применением. В результате уже в 50-х годах начали широко обсуждаться вопросы «лекарственной болезни». Этой проблеме посвящаются специальные симпозиумы. Создаются центры по изучению побочного действия лекарственных средств. Наиболее частой причиной осложнений, связанных с применением антибиотиков, являются аллергические реакции. Еще в 1945 г. Chow и McKee показали, что пенициллин связывается с альбуминовой фракцией сыворотки крови. Образующийся при этом комплекс характеризуется свойствами полноценного антигена и обуславливает продукцию антител. Самым тяжелым аллергическим осложнением при применении антибиотиков является анафилактический шок, от которого ежегодно погибает значительное число людей.

По данным HeideIman (1969), смертельный анафилактический шок только от введения пенициллина наблюдается у одного из 100 000 больных. Хотя остальные широко применяемые антибиотики и не вызывают столь частых смертельных исходов, количество более умеренных аллергических реакций остается значительным (на стрептомицин и дегидрострептомицин — до 50%, на новобиоцин — до 10%).

Попытки предупредить развитие аллергических осложнений путем предварительной постановки диагностических кожных проб не дали желаемых результатов. В настоящее время опубликован ряд сообщений о смертельных шоковых реакциях даже на диагностическую скарификационную или внутрикожную пробу с антибиотиками. С другой стороны, специфичность и чувствительность кожных проб при использовании антибиотиков оказались недостаточными. Выяснилось, что даже отрицательные результаты пробы непосредственно перед лечебным применением препарата

не исключают смертельного исхода. Специальные исследования на значительных группах больных показали, что внутрикожные пробы не дают диагностически значимых результатов при их использовании для выяснения сенсибилизации организма к лекарственным препаратам и в целях прогнозирования выраженных осложнений. Перечисленные обстоятельства и определили тот интерес, который до настоящего времени сопутствует попыткам исследователей применить для характеристики аллергии к антибиотикам и другим медикаментам различные реакции лейкоцитов крови.

В 1962 г. одновременно с изучением аллергии к туберкулину методом ППН мы предприняли попытку использовать этот же тест и для определения сенсибилизации больных туберкулезом к стрептомицину. Последний широко используется в лечебных целях и достаточно часто вызывает побочные реакции. Реакция нейтрофилов на стрептомицин была изучена у 91 больного. 43 исследования выполнялись в условиях проведения реакции на гликоген по Шабашу, а 48 — с применением окраски Паппенгейма — Крюкова. У всех обследованных больных диагностировался активный туберкулезный процесс в легких. По формам заболевания преобладали больные с фиброзно-кавернозным и инфильтративно-пневмоническим процессом (соответственно 38 и 21 человек).

В исследованиях, где использовалась реакция на гликоген, первоначально была апробована доза стрептомицина 100 мкг/мл крови. У большинства больных такая концентрация оказывала на гранулоциты «повреждающее» действие, вне зависимости от клинических симптомов непереносимости антибиотика. При этом в ходе микроскопии препаратов сравнительно часто встречались клетки, в которых при отсутствии амебоидной реакции наблюдалось выраженное перераспределение гликогена. Последний накапливался в краевых зонах цитоплазмы. Такие изменения следует, по-видимому, отнести к реакциям токсического типа. В этой связи характерно, что при аналогичной дозе дегидрострептомицина, который, как известно, обладает меньшей токсичностью, чем стрептомицин, эта форма реакции нейтрофилов встречалась реже.

Концентрация стрептомицина 25 мкг/мл крови оказалась для диагностики оптимальной. При анализе полученных при этом результатов все больные делились на три основные группы: с объективными признаками непереноси-

мости стрептомицина (сыпь, отечность лица, астмоидное состояние), с субъективными жалобами (головная боль, тошнота, шум в ушах) и удовлетворительно переносившие лечение. Оказалось, что из 9 больных с типичными аллергическими осложнениями высокая амебоидная реакция нейтрофилов (0,68—0,3) обнаружилась у 5 человек. Среди больных двух других групп аналогичная реакция была зарегистрирована у 27%.

При оценке внутриклеточных изменений в нейтрофилах крови (окраска препаратов по Паппенгейму—Крюкову) различия между группами больных были не столь отчетливы.

Результаты исследований показали, что как при первой, так и при второй модификации теста корреляции между интенсивностью реакции нейтрофилов на стрептомицин и его суммарным количеством, использованным для лечения больного, не было. В то же время среди больных, которые получали стрептомицин непосредственно перед определением ППН, повышенная и высокая степень реакции нейтрофилов встречалась в 2 с лишним раза чаще, чем среди остальных.

Изучение реакций нейтрофилов на стрептомицин производилось одновременно с определением ППН к туберкулину. Это позволило сопоставить выраженность амебоидных реакций в одном и другом случае. Какая-либо зависимость между результатами проб с антибиотиком и бактериальным аллергеном отсутствовала. Так, при отрицательном тесте на стрептомицин у  $\frac{1}{3}$  больных повреждаемость нейтрофилов туберкулином оказалась весьма высокой. И наоборот, среди больных, высокочувствительных к стрептомицину, было немало таких, у которых реакции на аллерген были слабыми. Следовательно, реакции на каждый из двух изучавшихся препаратов отличались автономностью и специфичностью.

Е. Ф. Чернушенко с сотр. (1974) осуществили анализ аллергических осложнений при антибактериальной терапии у больных туберкулезом. Они указали на весьма относительное диагностическое значение кожных проб при выявлении медикаментозной аллергии. В 55 случаях авторы применили тест ППН. У большинства больных эта реакция была положительной и ее результаты совпадали с клиническими данными.

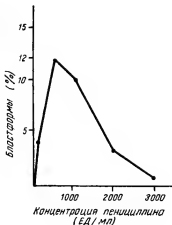
А. Н. Мац (1965), а затем и ряд других авторов (В. Е. Туганова, А. Н. Мац, И. П. Юсипова, 1965 и др.)

для оценки лекарственной аллергии использовали агломерационную пробу, представляющую собой модификацию техники учета лейкоэрического теста Флека (Flec, 1946). До настоящего времени единое мнение о специфичности этой реакции отсутствует.

П. Н. Юренев и Л. Н. Самойлова (1970) изучали агломерационную пробу у 75 больных с симптомами лекарственной непереносимости и дали ей положительную оценку.

Ими было поставлено 700 проб с 41 препаратом. Наиболее многочисленными оказались пробы с пенициллином и стрептомицином (48 и 29 исследований). Аналогичная оценка теста содержится в работе Е. М. Сергеев, К. В. Безденежных (1971). С другой стороны, П. Ю. Бородин и С. В. Шарапова (1971), обобщая данные, приведенные в ряде литературных источников, указывают, что лейкоэргия является неспецифическим ответом на различные патологические раздражения, и на основании собственных наблюдений отрицают специфическую природу реакции. Характерно, что М. К. Копылова и И. Я. Аболина (1970) обнаружили положительную агломерационную пробу к лекарственным препаратам и их комбинациям у всех 46 больных с туберкулезными или неспецифическими процессами в легких, хотя клинические симптомы лекарственной непереносимости проявились лишь у 9 человек. Авторы не считали нужным отменять препараты на основании результатов лабораторной диагностики. Интересные наблюдения приводят Л. П. Израйлет и Я. А. Хинцберг (1969), использовавшие метод лейкоэргии для оценки сенсибилизации рабочих, занятых в производстве антибиотиков. Ими было зарегистрировано, что среди лиц, имевших постоянный контакт с распыленными в воздухе антибиотиками (пенициллин и другие препараты) или с микробными продуцентами антибиотиков, выраженность лейкоэргии не отличалась от таковой, обнаруживаемой в группе работников, связанных с химическими растворителями, или у административно-хозяйственного персонала предприятия. В этом же исследовании отмечается, что среди лиц контрольной группы повышенные показатели лейкоэргии наблюдались у страдавших язвенной болезнью, а также после перенесенного воспаления легких или инфаркта миокарда. Если оценить с этих позиций сообщения, где лейкоэргия рассматривалась в качестве специфического теста, т. е. с позиций зависимости выраженности реакции от характера заболе-

Рис. 18. Зависимость бластообразования в культуре лимфоцитов от концентрации антибиотика (по Halpern, 1971).



вания, по поводу которого назначалась лекарственная терапия, то окажется, что данный аспект проблемы учитывался недостаточно.

С 1963 г. начали появляться публикации, отражающие результаты оценки лекарственной аллергии методом бласттрансформации лимфоцитов. В своих заключениях Hirschhorn (1963), Э. Н. Солошенко с сотр. (1971), Е. Ф. Чернушенко с сотр. (1974) указывают на сопоставимость результатов лимфобластической трансформации и клинических проявлений непереносимости лекарственных средств. Вместе с тем, как отмечает Ling (1968), многие авторы не смогли подтвердить, что БТЛ может служить тестом для выявления сенсибилизации к медикаментам. Обращает на себя внимание и тот факт, что различия в интенсивности реакции в разных работах оказались значительными. В одних случаях средняя частота обнаружения в препаратах бластных форм соответствовала 4%, а в других она достигала 50% (Ling, 1971). Разумеется, отмеченные расхождения могли зависеть не только от методических особенностей того или иного исследования, но и от ряда биологических причин, часть из которых была обсуждена в главе 7.

Как и при использовании других аллергенов для диагностики *in vitro*, в повседневной работе с медикаментами необходимо возможно дольше применять одни и те же серии препаратов. Нарушение этого условия затрудняет ориентацию клинициста.

Из числа моментов, зависящих от опыта лабораторного работника, наиболее сложным является подбор оптимальной концентрации лекарственного препарата. Как и при применении бактериальных аллергенов, линейная зависимость между концентрацией антибиотика и выраженностью бластной реакции отсутствует (Halpern, 1971) (рис. 18). Следует указать, что в большинстве опубликованных работ подбору оптимальных концентраций препаратов не уделялось достаточного внимания.

То обстоятельство, что непрямая реакция дегрануляции базофилов по Шелли зарекомендовала себя как специфический тест при проявлениях аллергии немедленного типа, обусловило попытки ее применения для диагностики медикаментозной аллергии. Положительная оценка реакции была дана П. Н. Юревым и соавт. (1969). В. П. Кищенко (1967) провела обследование 60 больных, из которых у 18 имелись общие и местные проявления сенсибилизации к пенициллину в момент обследования, а у 21 — только анамнестические сведения об аллергии к тому же антибиотику. Остальные больные не получали пенициллин и не имели в отношении этого препарата отягощенного анамнеза. При этом дегрануляция базофилов обнаружилась в большинстве случаев лишь у больных с клиническими симптомами непереносимости антибиотика (у 14 из 18 человек). Показатели у лиц, у которых аллергия была только в анамнезе, существенно не отличалась от показателей контрольной группы. Равнозначное заключение было сделано Э. Н. Солошенко и А. Я. Браиловским (1971). В работе Миси и соавт. (1970) непрямая дегрануляция базофилов в случаях медикаментозной аллергии была обнаружена лишь в 50% случаев. Близкие к этим результаты ранее были сообщены Feizi (1967).

Интересное исследование было выполнено Н. Д. Тагуновой (1971). Используя без каких-либо контролей непрямую пробу Шелли у 50 больных туберкулезом легких с клинически выраженными формами аллергии к основным противотуберкулезным препаратам (стрептомицин, тубазид, ПАСК), она зафиксировала недостаточную чувствительность теста в 24 случаях. Рассчитывая на более интенсивное образование антигенных комплексов, Н. Д. Тагунова предприняла попытку повысить чувствительность метода путем предварительной суточной инкубации препаратов с сывороткой больного. При этом у части больных с ранее отрицательными показателями (11 из 17) пробы оказались

положительными. Незначительный объем наблюдений и отсутствие проверочных работ со стороны других исследователей не позволяют пока определить отношение к данной модификации.

В исследовании Purelmutter и Khera (1970) мы находим материалы по оценке аллергии к пенициллину с помощью реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток. Реакция проводилась на предметных стеклах, однако для окраски тучных клеток (в отличие от постановки реакции в модификации Л. М. Ишимовой и Л. И. Зеличенко) были использованы обработанные нейтральным красным покровные стекла. Четыре капли смеси, состоящей из 0,05 мл суспензии тучных клеток крыс, равного объема пенициллина (1000 ЕД/мл) и профильтрованной перед исследованием сыворотки больного, помещали на участок предметного стекла, ограниченный четырьмя стенками, которые были образованы слоем вазелинового масла. Величина участка соответствовала размерам окрашенного покровного стекла. Последнее накладывали таким образом, чтобы окрашенная сторона соприкасалась со взвесью клеток. Сыворотки больных до момента фильтрования могли храниться до 3 мес при  $-20^{\circ}$ .

Всю систему, накрытую покровным стеклом, инкубировали при  $37^{\circ}$  5 мин, а затем до учета реакции содержали при комнатной температуре. В контрольных пробах сыворотку больного заменяли сывороткой нормальных крыс. В каждом препарате считывали 200 тучных клеток, не соприкасавшихся друг с другом. Обследование 12 больных с аллергией к пенициллину и 6 контрольных лиц дало удовлетворительные результаты. У сенсibilизированных больных дегрануляция тучных клеток под воздействием пенициллина была на 18—52% выше, чем в контрольных препаратах.

При использовании сыворотки здоровых людей контакт с антибиотиком усиливал дегрануляцию тучных клеток по сравнению с контролем только на 7%.

В условиях, когда для оценки лекарственной аллергии предлагаются различные методы диагностики, возникает необходимость параллельного сопоставления рекомендуемых тестов при обследовании одних и тех же групп больных. Между тем до последнего времени такие наблюдения отсутствовали. Нам известно лишь одно исследование (Г. П. Цветкова, 1969), в котором для оценки изменений в специфической реактивности рабочих, занятых производ-

ством антибиотиков, одновременно использовали три реакции: тест ППН по Фрадкину, специфический лизис лейкоцитов по Pettit и соавт. и агломерационную пробу Fleck в модификации А. Н. Маца.

Аллергия оценивалась к двум антибиотикам — пенициллину и стрептомицину. Для повышения надежности заключений к положительным относили лишь те иммуобиологические пробы, показатели которых находились выше пределов колебаний у лиц контрольной группы. Оказалось, что профессиональная лекарственная аллергия обнаружилась у большинства рабочих, связанных с выпуском препаратов. Было отмечено, что каждый из использованных тестов сравнительно часто был положительным. В то же время в своем основном выводе Г. П. Цветкова указала, что наиболее чувствительной из проб оказался тест ППН. Из тех рабочих, у которых наблюдались поражения аллергического характера (астмоидный бронхит, контактные дерматит и экзема, вазомоторные риниты, отеки Квинке и др.), показатель повреждения нейтрофилов и был учтен как положительный у 98%. Так, например, среднегрупповое значение ППН на пенициллин у этой категории лиц было в 8 раз большим, чем в контрольной группе ( $0,16 \pm 0,01$  и  $0,02 \pm 0,004$ ).

Близкие к этому различия между среднегрупповыми значениями наблюдались в реакции лизиса лейкоцитов ( $15 \pm 1,59$  и  $3 \pm 1,2$ ). При применении же теста агломерации лейкоцитов разница между показателями в аналогичных группах была значительно меньше ( $16,4 \pm 0,98$  и  $11,5 \pm 0,54$ ).

Говоря о ближайшей перспективе в области внедрения методов диагностики лекарственной аллергии *in vitro* в повседневную медицинскую практику, уместно подчеркнуть несколько обстоятельств. Лекарственная терапия, как правило, относится к экстренным методам лечения больных. При многих заболеваниях время, в течение которого врач обязан начать применение антибиотиков, исчисляется часами. В этой связи преимущества будут на стороне экспресс-методов. Если с этих позиций сопоставить обсужденные выше методики, то окажется, что результаты постановки теста ППН, реакции агломерации лейкоцитов и непрямой дегрануляции базофилов по Шелли могут быть получены в день исследования, а учет выраженности бласттрансформации лимфоцитов требует не менее 5—6 дней.

Широкое назначение лекарственных средств, с одной



стороны, и частота аллергических осложнений у больных при их применении — с другой, требуют не только высоко-специфичных, но и возможно более простых методов, доступных любому медицинскому учреждению.

К условиям, которые усложняют диагностику *in vitro*, следует отнести необходимость получения крови из вены (10—15 мл), а не путем прокола наружных кожных покровов, необходимость соблюдения полной стерильности при постановке реакций, необходимость использования, кроме крови больного и аллергена, специальных ингредиентов (питательная среда для культивирования лимфоцитов, лейкоциты кролика и т. д.).

Наконец, интересы больных требуют разработки и внедрения таких методов диагностики, которые будут способны выявить состояние медикаментозной аллергии до применения препарата с лечебной целью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

В настоящей монографии была предпринята попытка осветить комплекс вопросов, связанных с теоретическим обоснованием реакций *in vitro* лейкоцитов крови и тучных клеток на внесение в среду аллергенов инфекционной и неинфекционной природы. Детально были изложены методы постановки клеточных реакций и даны некоторые сведения о существе радио-аллерго-сорбентного теста. Определенное внимание было уделено и диагностической значимости получаемых результатов.

Следует иметь в виду, что, несмотря на несомненные успехи, достигнутые на этом пути за поразительно короткий срок, направление лабораторной диагностики аллергии только начинает развиваться. В специальной литературе систематически публикуются работы, в которых предлагаются новые методические подходы для оценки аллергии *in vitro*. Как правило, эти подходы вытекают из успехов иммунологии, молекулярной биологии, биофизики и других теоретических дисциплин. Разумеется, иммунологический механизм обсуждавшихся методов диагностики аллергии исследован к настоящему времени еще недостаточно полно. В большей мере это относится к оценке проявлений гипер-

чувствительности замедленного типа. Не все реакции в одинаковой мере подверглись клинической апробации. Не смогут считаться решенными и вопросы подбора оптимальных доз препаратов для каждого из обсуждавшихся тестов.

Во многих случаях приходится считаться с тем, что жидкие формы аллергенов, выпускаемые для скарификационных или внутрикожных проб, оказываются совершенно недостаточными для воспроизведения клеточных реакций *in vitro*. В первую очередь это относится к дозировкам, необходимым для постановок реакций с клетками-мишенями. Заметим, что в настоящее время к такому типу реакций необходимо причислить и реакции нейтрофилов крови. Для создания оптимальных условий диагностики *in vitro* необходим выпуск либо лиофилизированных форм препаратов (из них в процессе разведения могут быть приготовлены любые концентрации), либо концентрированных жидких форм. Исходя из этих соображений и был осуществлен выпуск ряда бактериальных аллергенов для теста ППН.

Повышение эффективности диагностики *in vitro* неотделимо от выяснения ряда вопросов, связанных с расшифровкой механизма тех или иных клеточных реакций. Так, обсуждая причины, в силу которых базофильный тест Шелли у ряда больных оставался отрицательным, мы обращали внимание на необходимость создания оптимального соотношения титра специфических антител в сыворотке крови и концентрации аллергена. Следует думать, что данный фактор имеет значение и для других клеточных реакций.

В настоящее время внимание многих исследователей привлекают вопросы корреляции функций различных клеточных элементов и зависимость от них различных специфических реакций, в том числе и иммунологических, с одной стороны при обсуждении бласттрансформации лимфоцитов подчеркивалось, что на воспроизводимость данного феномена могут оказывать влияние как полиморфноядерные лейкоциты, так и отдельные линии клеток стромы. С другой стороны, появились сообщения о том, что хемотоксическая активность нейтрофилов в части случаев может быть заторможена стрептолизинем 0. Помимо этого, из лейкоцитов человека удалось выделить фактор, необратимо подавлявший хемотоксическую активность гранулоцитов без повреждения их жизненных функций. Вполне

очевидно, что такая информация способна приблизить нас к пониманию отдельных фактов, когда возникает несоответствие между клинически выраженной сенсibilизацией обследуемого лица и результатами диагностики.

Одно из основных требований, предъявляемых к диагностике аллергии *in vitro*, состоит в обеспечении стандартности всех этапов исследования, начиная от способа получения клеточного субстрата и кончая методом обработки препаратов и схемой учета результатов. Особо следует подчеркнуть целесообразность длительного применения аллергенов одних и тех же серий и других биологических препаратов, учитывая допустимые колебания их активности в сравнении с утвержденными стандартами.

И тем не менее перечисленные обстоятельства не должны служить ограничением для широкого применения клеточных реакций. Совершенно очевидно, что специфическая диагностика *in vitro* отличается полной безопасностью и не имеет каких-либо противопоказаний. Это позволяет осуществлять повторные наблюдения в любые интервалы времени независимо от тяжести заболевания. Для клеточных реакций могут применяться любые сочетания диагностических препаратов. В число последних входят и весьма сложные по своему составу протозойные и вирусные аллергены, применение которых *in vivo* встречает обоснованные возражения. Не менее существен и тот факт, что, по мнению большинства исследователей, ряду специфических реакций лейкоцитов присуща большая информативность по сравнению с результатами накожных или внутрикожных проб. Достоинства методов диагностики *in vitro* позволяют рассчитывать на их широкое внедрение в аллергологическую практику.

## ЛИТЕРАТУРА

---

- Авербах М. М.* и др. Реакция торможения миграции сенсibilизированных лейкоцитов и активность туберкулезного процесса. — «Пробл. туб.», 1972, № 1, с. 112.
- Агапонов Б. Д.* Определение туберкулиновой аллергии у больных малыми формами туберкулеза легких. Конференция молодых ученых Курск. мед. ин-та, 1959, с. 11.
- Адо А. Д.* Новое в учении об аллергии. — В кн.: Вопросы аллергии. М., 1961, с. 5.
- Адо А. Д.* Вопросы патологической физиологии инфекционного процесса. — В кн.: Вопросы патологической физиологии и инфекционного процесса. М., 1962, с. 3.
- Адо А. Д.* Современная аллергология поллинозов. Вопросы иммунопатологии в клинике и эксперименте. — «Труды I Московск. мед. ин-та». Т. 48. М., 1966, с. 27.
- Адо А. Д.* Общая аллергология. М., 1970.
- Адо А. Д., Жуковский М. А.* Экспериментальные основы и клиника аллергических заболеваний у детей. — В кн.: Руководство по педиатрии. Т. 10. М., 1965, с. 187.
- Адо А. Д., Кончурин А. Х.* К вопросу об аллергенных свойствах антирабической вакцины Ферми. — «Вопр. вирусол.», 1960, № 1, с. 14.
- Безруков Л. А.* Сенсibilизация к некоторым «полным» бактериальным антигенам у детей с инфекционно-аллергическими заболеваниями. Автореф. дисс. канд. Киев, 1968.
- Беклемишев Н. Д.* Инфекционная аллергия. Алма-Ата, 1968.
- Беклемишев Н. Д.* Некоторые закономерности развития аллергии замедленного и немедленного типов. — В кн.: Инфекционная и неинфекционная аллергия. — Труды НИИ краевой патологии Т. XXI. Алма-Ата, 1971, с. 3.
- Беклемишев Н. Д., Бадина Л. К., Нурпеисов Т. Н.* и др. Изучению состояния гладких мышц при аллергических реакциях замедленного типа. Актуальные вопросы инфекционной и неинфекционной патологии. Алма-Ата, 1973, с. 3.
- Беклемишев Н. Д., Тугуров А. А.* К вопросу о медиаторах замедленного типа. Микробная аллергия. — Труды Ин-та краевой патологии. Т. XIV. Алма-Ата, 1967, с. 3.
- Бермонт И. Е.* О некоторых биологических, физико-химических и иммунологических свойствах реагинов при поллинозах. Автореф. дисс. канд. М., 1971.
- Гоздянов И. Л.* и др. Динамика аллергических показателей при некоторых вирусных и бактериальных нейроинфекциях. — «Врач. дело», 1972, № 12, с. 122.

- Богомолец А. А.** Сто вопросов по проблеме аллергии в современной патологии и клинике. Сборник работ конференции. «Аллергия». Киев, 1938, с. 9.
- Бондарев В. Н., Войтинский Е. Я.** Профилактика и лечение вакцинальных осложнений у детей. Л., 1972.
- Борис В. М.** Особенности послевакцинной и послеинфекционной аллергии у детей раннего и дошкольного возраста, привитых БЦЖ внутривакцинным методом. Автореф. дисс. канд. Львов, 1969.
- Бородин Ю. П., Шарапова С. В.** Изучение лейкоэрии при лекарственной аллергии. — «Антибиотики», 1971, № 9, с. 849.
- Брант А. Л., Азапонов Б. Д., Пекуровский Е. М.** Диагностика хронической туберкулезной интоксикации у детей. — «Пробл. туб.», 1972, № 2, с. 8.
- Васильева О. А. и др.** Показатель повреждения нейтрофилов крови при противооспенной вакцинации. Биологические препараты, иммунологическая реактивность организма. Томск, 1970, с. 83.
- Вейноров И. Б., Козосова Л. С., Рудченко Ю. А.** Значение некоторых показателей реактивности при определении активности туберкулеза кожи. — В кн.: Критерии активности ТБК. Киев, 1971, с. 140.
- Винникова Н. И.** Клинико-микробиологические особенности пародонтоза. Автореф. дисс. канд. М., 1965.
- Виноградов В. В.** Полифункциональны ли тучные клетки? — В кн.: Тучные клетки соединительной ткани. Новосибирск, 1968, с. 26.
- Вызодников Г. В., Мануйлова Н. С.** О парафагоцитозе. — «Ж. экспер. биол. и мед.», 1929, № 12, с. 197.
- Гервазиева В. Б.** Аллергическая альтерация лейкоцитов у больных поллинозами. Автореф. дисс. канд. М., 1968.
- Герсерт В. Я.** Реакции на гиперчувствительность замедленного типа в изучении активности туберкулезного процесса. Автореф. дисс. канд. М., 1970.
- Гудкова Р. Г.** О специфической десенсибилизирующей терапии бронхиальной астмы. — «Клин. мед.», 1967, № 5, с. 55.
- Гюллинг Э. В.** К вопросу о роли аллергии в патогенезе тонзиллитов. Автореф. дисс. канд. Киев, 1964.
- Давыдова А. В., Радунская С. Ф.** Люминесцентно-микроскопическое выявление амёбной реакции нейтрофилов крови в тесте ППН. — «Лаб. дело», 1973, № 11, с. 667.
- Дрюккер В. В.** Повышенная чувствительность замедленного типа, индуцированная листерийным антигеном. Автореф. дисс. канд. Томск, 1967.
- Жуклис Ю. П.** Реакция нейтрофилов крови на туберкулин как показатель активности туберкулеза у детей. XV научная сессия ин-та туберкулеза. Вильнюс, 1970, с. 87.
- Заварзин А. А.** Очерки эволюционной гистологии соединительной ткани. М., 1945.
- Засукина И. Б.** Аутоаллергическая повреждаемость нейтрофилов при туберкулезе. Автореф. дисс. канд. Фрунзе, 1972.
- Зеленова Е. Г.** Выявление аллергии при стафилококковой инфекции. Автореф. дисс. канд. Горький, 1971.
- Зеличенко Л. И.** Тучные клетки крыс в аллергических реакциях немедленного типа. Автореф. дисс. канд. М., 1969.

- Израйлет Л. И., Химценберг Я. А.* Лейкергия — объективный тест определений сенсибилизации рабочих, занятых в производстве антибиотиков. Материалы докл. XVI научной сессии Рижского мед. ин-та, 1959, с. 41.
- Ишимова Л. М.* Тучные клетки соединительной ткани и базофилы крови в диагностике аллергии немедленного типа. — В кн.: Проблемы иммунологической реактивности и аллергии. М., 1971, с. 146.
- Ишимова Л. М., Зеличенко Л. И.* О роли тучных клеток в аллергии — В кн.: Материалы конференции патофизиологов. Львов, 1967.
- Карпов С. П.* Аллергия при клещевом энцефалите, пути изготовления и контроля специфичности диагностического препарата. Материалы межинститутской научной конференции памяти Л. А. Тарасевича, 1967, с. 254.
- Касаткина И. Л.* Показатель повреждаемости нейтрофилов (ППН) при бруцеллезе. Микробная аллергия. Алма-Ата, 1967, с. 62.
- Кассирский И. А.* Классическая и молекулярная гематология. Актовая речь. М., 1968.
- Кассирский И. А., Алексеев Г. А.* Клиническая гематология, М., 1970.
- Киласония Л. О.* Некоторые иммуноаллергические показатели при инфекционно-аллергической бронхиальной астме. Автореф. дисс. канд. Тбилиси, 1972.
- Китаев М. И., Виноградова Н. Г.* Реакция повреждения нейтрофилов с туберкулиновым антигеном в диагностике туберкулеза глаз. — «Сов. здравоохран. Киргизии», 1971, № 1, с. 21.
- Китаев М. И., Езанов Е. П., Кулбаева С.* Аллергическая повреждаемость нейтрофилов при туберкулезе мочевой и мочеполовой системы. Туберкулез. Тезисы докл. 7-й научной сессии ПНИТ. Фрунзе, 1971, с. 72.
- Китаев М. И., Засухина И. Б.* Аутолейкоцитоз при туберкулезе легких — «Пробл. туб.», 1970, № 12, с. 52.
- Китаев М. И., Засухина И. Б.* Механизм аутоаллергической повреждаемости при туберкулезе. Туберкулез. Тезисы докл. 7-й научной сессии ПНИТ Фрунзе, 1971, с. 53.
- Китаев М. И., Морозов В. Л.* Аутоантитела в легочной патологии, Фрунзе, 1970.
- Кищенкова В. И.* К вопросу о роли аллергии при хроническом гнойном среднем отите. — «Труды 2-го Всероссийского съезда отоларингологов». Куйбышев, 1967, с. 177.
- Кищенкова В. И.* Тест Шелли при выявлении аллергии к пенициллину у больных хроническим гнойным средним отитом. — «Вестн. оториноларингологии», 1967, № 4, с. 47.
- Ковальский Г. В.* О роли тучных клеток в иммунологических процессах. — В кн.: Тучные клетки соединительной ткани. Материалы симпозиума. Новосибирск, 1968, с. 132.
- Когосова Л. С., Чернушенко Е. Ф.* Применение реакции бласттрансформации лимфоцитов. — «Пробл. туб.», 1970, № 4, с. 75.
- Копылова М. К., Аболина И. Я.* Агломерационная проба у больных с лекарственной аллергией. Материалы докл. XVII научной сессии Рижского мед. ин-та, 1970, с. 106.
- Кочнова И. Е.* Противотуберкулезная вакцинация и ревакцинация взрослых. — Труды 7-го Всероссийского съезда фтизиатров 1964 г., М., 1966, с. 140.

- Кравченко А. Т.* Влияние анафилактического шока на инфекционную аллергию к бруцеллам. — Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1938, № 4, с. 22.
- Кравченко А. Т., Галанова Н. В.* Третий фактор приобретенного иммунитета. Иммунитет и аллергии клеток. М., 1948.
- Кузнецова Н. И.* Иммунологическое исследование мозга. Автореф. дисс. докт., М., 1970.
- Кулик Н. М.* Проба туберкулинового лейколизиса для определения активности туберкулезного процесса. — В кн.: Профилактика и лечение туберкулеза. Киев, 1964, с. 45.
- Лейтес Ф. Л., Семашко М. И.* Сопоставление сенсibilизирующих свойств некоторых вакцин при помощи изучения морфологии тучных клеток. — В кн.: Тучные клетки соединительной ткани. Материалы симпозиума. Новосибирск, 1968, с. 143.
- Лернер И. Ш., Брусиловский Е. С.* Аллергические эозинофильные заболевания. Киев, 1961.
- Лусс Л. В.* Вопросы диагностики аллергии к коровьему молоку у детей. Автореф. дисс. канд. М., 1971.
- Малютина Т. Д.* Клиника и течение хронически текущего первичного туберкулеза легких у детей. Автореф. дисс. канд. М., 1968.
- Манько В. М., Михайлова А. А., Сеславина Л. С.* Эффекты и механизмы взаимодействия аллогенных клеток. — В кн.: Общие вопросы патологии. Т. 3. М., 1972, с. 154.
- Марчак В. В.* Об устойчивости лейкоцитов к туберкулину у больных с различной степенью активности туберкулеза легких. — В кн.: Некоторые вопросы морфологии человека и животных. Одесса, 1968, с. 152.
- Маслова М. С.* Реакция нейтрофилов крови на туберкулин при глазных заболеваниях. — «Вест. офтальмол.», 1971, № 4, с. 89.
- Мац А. И.* Изучение лейкоергии при туберкулезе легких. Автореф. дисс. канд. М., 1965.
- Медведев В. И.* К вопросу о роли аллергии в патогенезе аденоидных вегетаций и их послеоперационных рецидивов. — Труды 2-го Всероссийского съезда отоларингологов. Куйбышев, 1967, с. 121.
- Медуницин Н. В.* Замедленная аллергия к растворимым белкам. Автореф. дисс. докт. М., 1970.
- Николаева Н. В., Карибская А. В., Човжик А. Г.* Определение активности первичного туберкулеза у детей. — «Пробл. туб.», 1972, № 2, с. 30.
- Петухова М. А.* Клинико-иммунологические показатели при листериозе у людей и экспериментальных животных. Автореф. дисс. канд. Челябинск, 1973.
- Покровская М. П., Каганова Л. С.* Цитологический метод изучения механизма иммунитета. Свердловск, 1947.
- Польнер А. А.* Природа и свойства антител при аллергии. — В кн.: Успехи экспериментальной аллергологии. Вып. 1. М., 1968, с. 3.
- Польнер А. А.* О некоторых видах антител к аллергенам растительной пыльцы. Автореф. дисс. докт. М., 1971.
- Позитонов М. П.* Детский туберкулез и изменение его течения при современных методах лечения. — В кн.: Туберкулез у детей и подростков. М., 1962, с. 5.
- Рабен А. С., Алексеева О. Г., Дуева Л. А.* Экспериментальный аллергический контактный дерматит. М., 1970.
- Райзлин Н. Т.* Лизосомы в норме и патологии. — «Арх. пат.», 1971, № 4, с. 73.

- Сазаров П. П., Гудкова Е. И., Кудрина Г. П. Реактивные изменения лейкоцитов крови при бактериальной аллергии. — «Клин. мед.», 1971, № 3, с. 80.
- Сейц И. Ф., Луганова И. С. Биохимия клеток крови и костного мозга в норме и при лейкозах. М., 1967.
- Семенов С. Ф. Понятие о болезни и преморбидных состояниях в свете проблемы реактивности. — В кн.: Аутоиммунные процессы при врожденных энцефалопатиях, эпилепсии и шизофрении. М., 1973, с. 3.
- Сергеюк Е. М., Безденежных К. В. Реакция агломерации лейкоцитов как метод диагностики аллергических осложнений, вызванных антибиотиками. — «Здравоохран. Туркмении», 1974, № 12, с. 6.
- Серова Т. И. Реакция базофилов крови при поллинозах. Автореф. дисс. канд. М., 1973.
- Сиротинин Н. Н. Об эволюции реактивности организма и ее влиянии на инфекционный процесс. — «Мед. ж.», 1951, № 4, с. 51.
- Скавинский Ю. В. К диагностике бруцеллеза методом определения повреждаемости нейтрофилов (ППН). Проблемы зоонозов. Материалы конференции. Пятигорск, 1964, с. 67.
- Скавинский Ю. В. Материалы по изучению токсоплазмоза в Красноярском крае. Автореф. дисс. докт. Красноярск, 1970.
- Соловьев В. Д., Баландин И. Г. Клетка и вирус. М., 1973.
- Солошенко Э. Н., Браиловский А. Я. Тест Шелли в диагностике лекарственной аллергии. — «Лабор. дело», 1971, № 5, с. 266.
- Тавровский В. М., Чумакова Л. П., Шик А. Р. Изменение специфической аллергии у больных туберкулезом легких в ближайшие сроки после резекции легкого. — «Пробл. туб.», 1973, № 8, с. 16.
- Тагунова Н. Д. Модификация теста Шелли. — «Здравоохран. Белоруссия», 1971, № 4, с. 82.
- Тимофеевский А. Д., Беневоленская С. В. Туберкулезная инфекция в культуре лейкоцитов крови человека. Юбилейный сборник, посвящ. проф. В. И. Мыш. Томск, 1925, с. 279.
- Троцкий С. А., Филюшина З. Г. О продолжительности пребывания лейкоцитов (нейтрофилов) в сосудах при интоксикации и в норме. — «Пробл. гематол. и перелив. крови», 1963, № 7, с. 52.
- Трунова Л. А. Изучение клеточных реакций иммунитета. Автореф. дисс. докт. Новосибирск, 1970.
- Тузанова В. Е., Мац А. Н., Юсипова И. П. Феномен агломерации лейкоцитов при диагностике лекарственной аллергии. — «Клин. мед.», 1965, № 12, с. 19.
- Федоров И. И. и др. К методике определения лейколиза в крови. — «Лабор. дело», 1971, № 5, с. 268.
- Фенстер Г. С. Устойчивость нейтрофилов к туберкулину как один из возможных показателей активности туберкулеза легких. Сборник материалов конференции молодых фтизиатров Ленинграда. Л., 1968, с. 46.
- Фрадкин В. А. Реакция нейтрофилов крови как показатель инфекционной и лекарственной аллергии. — «Сов. мед.», 1962, № 9, с. 41.
- Фрадкин В. А., Пляш Н. Н. Изучение аллергии у больных туберкулезом детей реакцией нейтрофилов крови *in vitro*. — «Вопр. охр. мат.», 1965, № 12, с. 23.
- Фрадкин В. А., Лавренчик Е. И., Розмаинская З. Н. Трансформация лимфоцитов периферической крови при стимуляции ФГА у больных туберкулезом легких. — «Сов. мед.», 1971, № 2, с. 15.



- Фрадкин В. А., Соломатина О. Г.* Реакция нейтрофилов крови на стрептококковый аллерген. Ревматизм и другие коллагенозы у детей. М., Изд-во ЦИУ, 1963.
- Фриденштейн А. Я.* Клеточные основы иммунитета. Современные аспекты иммунологии. XXXIV сессия АМН СССР. М., 1973, с. 7.
- Хрущев Г. К.* Лейкоцитарные системы млекопитающих и их эволюция. — Труды 5-го Всесоюзного съезда анатомов, гистологов, эмбриологов. 1949 г. Л., 1951, с. 22.
- Хутуева С. Х.* Поллинозы у детей. Автореф. дисс. канд. М., 1970.
- Цветкова Р. П.* Аллергическая реактивность организма работающих на производстве антибиотиков. — «Сов. мед.», 1969, № 5, с. 75.
- Чернушенко Е. Ф.* и др. Клиническая и иммунологическая диагностика лекарственной аллергии. — В кн.: Аллергия. Киев, 1974, вып. 1, с. 111.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я.* Кооперативное взаимодействие клеток при иммунном ответе. — «Успехи совр. биол.», 1972, № 2, с. 292.
- Чистович Н. Я.* Новейшие исследования по вопросу о лейкоцитолитизе. СПб, 1896 (отдельный оттиск).
- Чумакова Л. П.* Показатель повреждаемости нейтрофилов как критерий активности малых форм туберкулеза. — «Пробл. туб.», 1973, № 2, с. 78.
- Чуприков А. П.* Изучение реакции нейтрофилов и сыворотки больных шизофренией на антигены из мозга. — «Ж. невропатол. и психиатр.», 1967, № 6, с. 918.
- Шабаташ А. Л.* Цитохимические особенности рибонуклеопротеидов митохондрий и эргастоплазмы. — «Цитология», 1959, № 4, с. 15.
- Шмелев Н. А.* Система нейтрофилов в костном мозгу и в периферической крови. — «Сов. мед.», 1966, № 2, с. 3.
- Юрнев П. Н.* Аллергические реакции немедленного типа при некоторых поражениях сердца и сосудов. — В кн.: Проблемы аллергологии. М., 1971, с. 243.
- Юрнев П. Н., Самойлова Л. Н.* Вопросы диагностики лекарственной аллергии. — «Тер. арх.», 1970, № 8, с. 21.
- Юрнев П. Н., Самойлова Л. Н., Сутягина В. Л.* Реакция дегрануляции базофильных лейкоцитов при лекарственной аллергии. — В кн.: Вопросы патогенеза и клиники аллергических заболеваний. Вып. 2. М., 1969, с. 105.
- Augustin R.* In vitro tests for reagins involving leucocytes estimation of reagins by double layer leucocyte agglutination. V Congr. Int. Allergol. Madrid, 1964, p. 159.
- Bendixen G., Sæborg M.* Comments of the leucocyte migration technique. — «J. Immunol.», 1970, v. 104, N 6, p. 1551.
- Bessis M.* Studies on cell agony and death: an attempt at classification. Cellular injury. Ciba Foundation Sympos. London, 1964, p. 287.
- Black A.* A new diagnostic method in allergic diseases. — «Pediatrics», 1956, v. 17, N 5, p. 716.
- Blatt H., Nantz F., Rehm J.* An improved tissue culture technique adaptable to clinical testing for bacterial hypersensitivity of the tuberculin type. — «Ann. Allergy», 1947, v. 7, N 3—4, p. 170.
- Boreus L.* Quantitative studies on the anaphylactic mastcell reaction in vivo in the guinea pig. — «Acta physiol. scand.», 1960, v. 48, N 4, p. 431.

- Boyd W.** Fundamentals of immunology. N. Y., 1966.
- (Burnet F.) Бернет Ф.** Клеточная иммунология. Пер. с англ. М., 1971.
- Caron G.** Duration of exposure of lymphocytes to antigen in vitro needed to induce blast transformation.—«Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol.», 1967, v. 32, N 1, p. 98.
- Ceska M., Eriksson R., Varga J.** Radioimmunosorbent assay of allergens.—«J. Allergy a. Clin. Immunol.», 1972, v. 49, N 1, p. 1.
- Charpin J. e. a.** Study of the degranulation of basophil polymorphonuclears in the course of Shelley's test.—«Path. et Biol.», 1965, v. 13, N 5—6, p. 264.
- (Chase M.) Чейз М.** Замедленная чувствительность и ее значение. Симпозиумы. IX международный конгресс по микробиологии. М., 1966, с. 422.
- Chow B., McKee C.** Interaction between crystalline penicillin and human plasma proteins.—«Science», 1945, v. 101, p. 67.
- Clausen J.** Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in Agarose medium.—«Acta Allergol.», 1971, v. 26, N 1, p. 56.
- Clausen J.** Comparison between capillary tube and agarose migration technique in the study of human peripheral blood leucocytes.—«Acta Allergol.», 1973, v. 28, N 7, p. 145.
- Coulson A., Chalmers D.** Response of human blood lymphocytes to tuberculin PPD in tissue culture.—«Immunology», 1967, v. 12, N 4, p. 417.
- Craddock C., Longmire R., McMillan R.** Lymphocytes and the immune response. Part 1.—«N. Engl. J. Med.», 1971, v. 285, N 6, p. 324.
- Criep L.** Clinical immunology and allergy. N. Y., 1962.
- Czizmas L.** Preparation of formalized erythrocytes. «Proc. Soc. exp. Biol.», 1960, v. 103, N 1, p. 157.
- Cruchaud S., Frei P.** Demonstration of specific antibodies on human circulating lymphocytes by a new technique.—«Internat. Arch. Allergy a. Appl. Immunol.», 1967, v. 31, N 5, p. 455.
- Cruikshank C., Path M., Haye K.** The responses of the basophil leukocyte.—«Invest. Dermatol.», 1968, v. 51, p. 324.
- Csaba G., Toró I., Bodoky M.** Über die Bildung von Mastzellen im Tymus und den Lymphatischen Organen.—«Zschr. microscop. anat. Forsch.», 1963, Bd 70, N 2, S. 243.
- Donner L.** Nekteré uvahu o fyziologii bílých krvinek.—«Vnitřní lékař», 1960, N 3, p. 281.
- (De Duve K.) де Дюв К.** Лизосома. Живая клетка. (Сборник статей.) Пер. с англ. Под ред. Г. М. Франка. М., 1966, с. 205.
- Evans D., Thomson D.** Histamine release from rat mast cells passively sensitized with homocytotropic (IgE) antibody.—«Internat. Arch. Allergy a. Appl. Immunol.», 1972, v. 43, N 2, p. 217.
- Favour C.** Lytic effect of bacterial products on lymphocytes of tuberculous animals.—«Proc. Soc. exp. Biol. Med.», 1947, v. 65, p. 269.
- Feizi T.** The indirect basophil degranulation test for allergy to penicillin.—«Franc. St. John's Hosp. derm. Sec.», 1967, v. 53, N 2, p. 162.
- Fleck L.** Zellspezifische Autoagglutinine als Regulatoren der Zytologischen Zusammensetzung des Blutes Schweiz. med. Wschr., 1946, Bd 76, N 9, S. 175.

- Friedlaender S., Friedlaender A.* Observations on basophil degranulation as an indicator of antigen-antibody reaction.— «Allergy», 1964, v. 35, p. 361.
- Fumaroja D.* Blastoid transformation of lymphocytes by staphylococcal aggressin.— «Ann. Sclavo», 1969, v. 11, N 6, p. 633.
- Green J., Day M.* Цит. по Виноградову В. В. Полифункциональные ли тучные клетки?— В кн.: Тучные клетки соединительной ткани. Новосибирск, 1968, с. 26.
- Hall H., Scherago M.* The sensitivity of human leucocytes to Old Tuberculin.— «Amer. Tuberc. Pulm. Dis.», 1947, v. 75, N 5, p. 807.
- Halpern B.* L'Allergie. Paris, 1969.
- Halpern B.* Les aspects cliniques de la transformation lymphoblastique. Some aspects of the pathophysiology and therapy of allergy. Symp. M., 1971, p. 9.
- Hamilton L.* The leukemia, etiology, pathophysiology and treatment. Louisiana cancer conf. Etiology and treatment of leukemia. N. Y., 1958, p. 381.
- Heidelmann G.* Nebenwirkungen der Antibiotika. Z. ärztl. Fortbild, 1969, Bd 63, N 2, s. 57.
- Henson P.* The immunologic release of constituents from neutrophil leucocytes.— «J. Immunol.», 1971, v. 107, N 6, p. 1547.
- Hinz C., Chlcosky J.* Factor influencing the stimulation of human lymphocytes by antigen during culture in vitro.— «Internat. Arch. Allergy a. Appl. Immunol.», 1972, v. 42, N 6, p. 836.
- Hirschhorn K.* Discussion of lymphocyte transformation.— «Fed. Proc.», 1968, v. 27, N 2, p. 31.
- Horie A.* Фукуока игаку дзасси.— «Fukuoka acta med.», 1972, v. 63, N 7, p. 254.
- Hunderford D. e. a.* The chrosome constitution of a human phenotypic intersex.— «Amer. J. Hum. Genet.», 1959, v. 11, N 3, p. 215.
- Ishisaka T. e. a.* Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release.— «J. Immunol.», 1972, v. 108, N 4, p. 1000.
- Johansson S., Bennich H., Foucard T.* Quantitation of IgE antibodies and allergens by the radioallergosorben test, RAST.— «Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.», 1973, v. 45, N 1—2, p. 55.
- Jonson R., Smith T., Kirkpatrick Ch.* Augmentation of phytohemagglutinin mitogenic activity by erythrocyte membranes.— «Cell. Immunol.», 1972, v. 3, N 2, p. 186.
- Kasakura S.* Blastogenic factor from unstimulated leukocyte cultures: further evidence for heterogenetity and mechanism of production.— «J. Immunol.», 1972, v. 109, N 6, p. 1352.
- Katz G., Cohen S.* Experimental evidence of histamine release in allergy.— «J.A.M.A.», 1941, v. 117, p. 1782.
- Kreth H., Williamson A.* Cell surveillance model for lymphocyte cooperation.— «Nature», 1971, v. 234, N 5330, p. 454.
- Lagunoff D. e. a.* Isolation and preliminary characterization of rat mast cell granules.— «Lab. Invest.», 1964, v. 13, N 11, p. 1331.
- «Lancet», 1973, No. 7800, 409, art. «The Lymphocyte».
- Lawrence H.* Factors and activities produced in vitro by lymphocytes.— In vitro methods in cell-mediated immunity. N. Y., 1971, p. 95.

- Lawrence H.* Biological implications of in vitro phenomena.— In: In vitro methods in cell-mediated immunity. N. Y., London, 1971, p. 168.
- Levy D.* Studies of histamine release from human leucocytes.— «Ann. Allergy», 1969, v. 27, N 10, p. 511.
- Lichtenstein L., Osler A.* Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena.— «J. exp. Med.», 1964, v. 120, N 4, p. 507.
- (Ling N. R.) Н. Р. Лунг.* Стимуляция лимфоцитов. Пер. с англ. М., «Медицина», 1971.
- (Luria S., Darnell D.) Лурия С., Дарнелл Д.* Общая вирусология. Пер. с англ. М., 1970.
- Makness G.* Cellular resistance to infection.— «J. exp. Med.», 1962, v. 116, p. 381.
- Martin R., White A.* The in vitro release of leukocyte histamine by staphylococcal antigens.— «J. Immunol.», 1969, v. 102, N 2, p. 437.
- May Ch. e. a.* General features of in vitro antigenic release of histamine from leucocytes of allergic children.— «Am. Acad. Allergy», 1968, v. 41, N 2, p. 91.
- May Ch. e. a.* Procedures for immunochemical study of histamine release from leucocytes with small volume of blood.— «J. Allergy», 1970, v. 46, N 1, p. 12.
- Micu D., Makimilian S., Popescu J.* Testul de degranulare a bazofilelor in alerga medicamentoasa.— «Viata medicala», 1970, v. 17, N 3, p. 117.
- Middleton E., Sherman W.* Relationship of complement to allergic release in blood of ragweed sensitive subjects.— «J. Allergy», 1960, v. 31, N 5, p. 441.
- Mitchison N.* Cell cooperation in the immune response: the hypothesis of an antigen presentation mechanism. Immunopathology, 6th Int. Symp. Basel, 1971, 52. Discuss. 63.
- Nossal G.* Antibodies and immunity. N. Y.— London, 1969.
- Nota N. e. a.* L'immuno-cyto-adherence: une methode simple et quantitative pour l'etude in vitro des cellules productrices d'anticorps. C. R. Acad. Sc. Paris, 1964, v. 259, N 5, p. 1277.
- Nowell P.* Differentiation of human leucemic leucocytes in tissue culture.— «Exp. Cell Res.», 1960, v. 19, N 2, p. 267.
- O'Neil E., Favour C.* Tissue culture analysis of tuberculin hypersensitivity in man.— «Am. Rev. Tuberc.», 1955, v. 72, p. 77.
- Osler A., Lichtenstein L., Levy D.* In vitro studies of human reagenic allergy.— «Adv. Immunology», 1968, v. 8, p. 183.
- Paty D., Hughes D.* Lymphocyte transformation using whole blood cultures: an analysis of responses.— «J. Immunol. Meth.», 1972, v. 2, N 1, p. 99.
- Pearmain G., Lycette R., Fitzgerald P.* Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet, 1963, v. 1, p. 637.
- Pentecross C.* Technique for lymphocyte transformation.— «J. clin. Path.», 1968, v. 21, N 2, p. 71.
- Perelmutter L., Khara K.* A study of the detection of human reagins with rat peritoneal mast cells.— «Internat. Arch. Allergy a. Appl. Immunol.», 1970, v. 39, N 1, p. 27.
- Pettit H., Sullivan H., Hart E.* In vitro leucocytolysis in presence of pollen and house dust antigen.— «J. Allergy», 1961, v. 32, N 1, p. 30.
- (Pollicard A.) Поликар А.* Молекулярная цитология мембранных систем животной клетки. Пер. с франц. М., 1972.

- Pruzansky J., Patterson R.* Subcellular distribution of histamine in human leucocytes.—«Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.», 1967, v. 124, p. 56.
- Pruzansky J., Patterson R.* Stability of human leucocyte granules which contain histamine.—«J. Immunol.», 1968, v. 100, N 6, p. 1165.
- Ranadive N., Cochrane C.* Mechanism of histamine release from mast cells by cationic protein (band 2) from neutrophil lysosomes.—«J. Immunol.», 1971, v. 106, N 2, p. 506.
- Rabinowitz Y.* Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations.—«Blood», 1964, v. 23, N 6, p. 811.
- Rich A., Lewis M.* Mechanism of allergy in tuberculosis. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1928, v. 25, p. 596.
- Richter M., Naspitz C.* The in vitro blastogenic response of lymphocytes of ragweed-sensitive individuals.—«J. Allergy», 1968, v. 41, N 3, p. 140.
- Robbins J., Haimovich J., Sela M.* Purification of antibodies with immunoabsorbents prepared using bromoacetyl cellulose.—«Immunochemistry», 1967, v. 4, p. 11.
- Rosenberg S.* Methods for study of mediators.—In: In vitro methods in cell-mediated immunity. N. Y., London, 1971, p. 20.
- Schechter G., Farland W.* Interaction of lymphocytes and a radio-resistant cell in PPD — stimulated human leukocyte cultures.—«J. Immunol.», 1970, v. 105, N 5, p. 661.
- Schwartz G., Vardinon N.* In vitro prevention of direct mast cell disruption by specific antibody.—«Internat. Arch. Allergy a. Appl. Immunol.», 1966, v. 30, p. 67.
- Shelley W.* Indirect basophil degranulation test for allergy to penicillin and other drugs.—«J. Allergy», 1963, v. 34, N 4, p. 59.
- Shelley W.* Circulating basophil as indicator of hypersensitivity in man.—«Arch. Dermat.», 1963, v. 88, p. 759.
- Soborg M., Bendixen G.* Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity.—«Acta med. scand.», 1967, v. 181, N 2, p. 247.
- Tanaka K., Valentine W., Fredericks R.* Human leucocyte arylsulphatase activity.—«Brit. J. Haematol.», 1962, v. 8, N 1, p. 86.
- Torelli e. a.* RNA and protein synthesis in normal peripheral mononuclear leucocytes.—«Acta Haematol.», 1970, v. 105, N 3, p. 661.
- (Udenfriend S.) Юденфренд С.* Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. Пер. с англ. М., 1965.
- Valentine W. e. a.* The relationship of the basophil to blood histamine in man. Blood, 1955, v. 10, p. 154.
- Virtue C., Wittig H., Cook T.* Lymphocyte transformation with bacterial antigens in intrinsic asthma.—«J. Allergy a. Clin. Immunol.», 1971, v. 48, N 6, p. 321.
- Waithe W., Hirschhorn K.* An assay of lymphocyte blastogenesis based on measurement of rate of protein synthesis.—In: In vitro methods in cell-mediated immunity N. Y., London, 1971, p. 455.
- Weissmann.* Цит по *Hirschhorn R.* Biological implications of in vitro phenomena.—In: In vitro methods in cell-mediated immunity. N. Y.—London, 1971, p. 22.

- Wide L., Bennich H., Johansson S.* Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies.— «Lancet», 1967, N 7526, s. 1105.
- Wiesener H., Schulze J.* Leukocytenphagocytose und Tuberkulinleulyse bey tuberkulosekranken Kindern.— «Z. Kinderh.», 1957, Bd. 80, N 2, S. 111.
- Witte S.* Morphologische und serologische studien über tuberkulinwirkungen an leucocyten in vitro.— «Beitr. Klin. Tuberk.», 1950, Bd. 104, N 3—4, s. 252.
- (Witebsky E.) Витебский Э.* Аутоенсибилизация и болезнь. Современные проблемы иммунологии и иммунопатологии. Л., 1970, с. 129.
- Zabriskie J.* Methods for study of mediators.— In: In vitro methods in cell-mediated immunity. N. Y.— London, 1971, p. 29.
- Zeitz S., van Arsdel P., McClure D.* Specific response of human lymphocytes to pollen antigen in tissue culture.— «J. Allergy», 1966, v. 38, N 6, p. 321.
- Zetterström O., Fagerberg E., Wide L.* An investigation of pollen extracts.— «Acta Allergol.», 1972, v. 27, p. 15.

# О Г Л А В Л Е Н И Е

Предисловие . . . . .	3
Введение . . . . .	5
Глава 1. Лейкоциты крови и задачи специфической диагностики аллергии . . . . .	8
Лейкоциты гранулоцитарного ряда . . . . .	15
Лейкоциты агранулоцитарного ряда . . . . .	22
Глава 2. Показатель повреждения нейтрофилов по Фрадкину (тест ППН) . . . . .	27
Механизм теста ППН . . . . .	37
Тест ППН при туберкулезе . . . . .	42
Дифференцировка инфекционной и вакцинальной аллергии к туберкулину . . . . .	52
Тест ППН при других инфекциях . . . . .	54
Тест ППН при аутоиммунных процессах . . . . .	60
Глава 3. Тест альтерации нейтрофилов . . . . .	65
Глава 4. Оценка специфического «повреждения» лейкоцитов крови методом люминесцентной микроскопии . . . . .	70
Глава 5. Реакция базофилов по Шелли . . . . .	73
Глава 6. Реакция специфического лейколиза . . . . .	80
Глава 7. Реакция бласттрансформации лимфоцитов крови (БТЛ) . . . . .	83
Бластотрансформация с туберкулином . . . . .	93
Бласттрансформация с бактериальными аллергенами и продуктами жизнедеятельности микроорганизмов . . . . .	94
Бластотрансформация с аллергенами из растительной пыльцы . . . . .	95
Глава 8. Реакция торможения миграции лейкоцитов крови . . . . .	96
Глава 9. Реакция агглютинации лейкоцитов . . . . .	103
Глава 10. Реакция дегрануляции тучных клеток соединительной ткани . . . . .	104
Глава 11. Реакция выделения лейкоцитами крови гистамина как метод изучения аллергии . . . . .	110
Глава 12. Применение эритроцитов в непрямых иммунологических тестах для оценки аллергии . . . . .	115
Глава 13. Радио-аллерго-сорбентный тест (РАСТ) . . . . .	118
Глава 14. Методы оценки лекарственной аллергии . . . . .	121
Заключение . . . . .	129
Литература . . . . .	132

*Фрадкин Владимир Александрович*

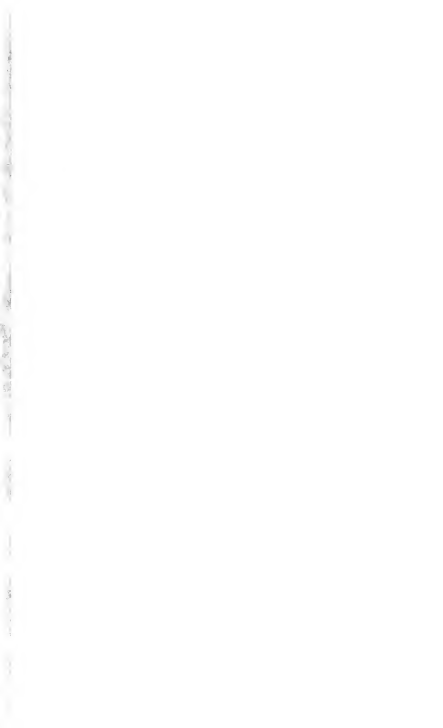
**АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА in vitro**

Редактор *В. И. Литвинов*  
Художественный редактор *Л. С. Вирюкова*  
Техн. редактор *Н. К. Петрова*  
Корректор *Т. И. Антонова*  
Обложка художника *Г. Л. Чижевского*

Сдано в набор 4/IX 1974 г. Подписано к печати 3/II 1975 г. Формат бумаги  $84 \times 108 \frac{1}{2}$ —4,5 печ. л. +0,19 печ. л. вкл. (условных 7,88 л.) 8,17 уч.-изд. л. Бум. тип. № 1. Тираж 8000 экз. Т 00958. МН-71. Заказ 5209.

Издательство «Медицина», Москва, Петроверигский пер., 6/8.  
Типография издательства «Горьковская правда», г. Горький, ул. Фигнер, 32.  
Цена 77 коп.





77 коп.

---

МЕДИЦИНА·1975

---